

Die Zytotoxizität von Adriamycin
in Abhängigkeit von Konzentration
und Einwirkungsdauer in Kulturen
asynchron wachsender chinesischer
Hamsterzellen und menschlicher
Nierenzellen

Klaus Walter

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München
Direktor: N. N.

Die Zytotoxizität von Adriamycin in Abhängigkeit
von Konzentration und Einwirkungsdauer in
Kulturen asynchron wachsender chinesischer
Hamsterzellen und menschlicher Nierenzellen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Klaus WALTER
aus München

MÜNCHEN 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. R. Trott

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Riethmüller

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 12. 1982



Gliederung:

- 1) Experimentell nachzuprüfende Fragestellungen und ihre Ableitung
- 2) Material und Methoden
 - 2.1) Das verwendete Zytostatikum
 - 2.1.1) Die chemische Struktur und die physikalischen Grunddaten von Adriamycin
 - 2.1.2) Zur Pharmakokinetik und -dynamik von Adriamycin
 - 2.2) Versuchsaufbau und Durchführung
 - 2.2.1) Verwendete Zelllinien, Anlegen von Passagen und Zellkulturen
 - 2.2.2) Aufstellen der Versuchsansätze, Inkubationsbedingungen
 - 2.2.3) Färben und Auszählen der Zellkolonien
 - 2.2.4) Darstellung der Auswertungsmethoden und -prinzipien
 - 2.3) Die chemische Zusammensetzung der Versuchsreagentien
- 3) Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus den Vorversuchen
 - 3.1) Abhängigkeit der Überlebensrate vom Alter der Adriamycinlösung
 - 3.2) Abhängigkeit der Ergebnisse von der Anzahl der Spülungen
 - 3.3) Der Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die Überlebensrate
- 4) Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus den Hauptversuchen
 - 4.1) Exposition von B-14 Kulturen gegenüber Adriamycin über 4-8-24 Stunden

- 4.2) Exposition von HAK-Kulturen gegenüber Adriamycin über 4-8-24 Stunden
- 4.3) Vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse
- 4.4) Die Ergebnisse der Dreifachen Varianzanalyse bzgl. der Signifikanz der Beobachtungsmerkmale
- 4.5) Antwort-Zeit-Beziehungen zwischen B-14 und HAK-Zellen bei jeweils konstanter Konzentration
- 5) Diskussion der Resultate aus den Hauptversuchen mit der Referenzliteratur
- 6) Erklärungsmöglichkeiten für die zytozide Wirkung von Adriamycin durch das Interferenzmodell
- 7) Zusammenfassung
- 8) Literaturübersicht
- 9) Anhang
 - 9.1) Zusammenstellung der Resultate aus den Einzelversuchen; Zusammenfassung der Daten für die einzelnen Einwirkzeiten
 - 9.2) Erläuterung und Erklärung der statistischen Auswertungsmethoden

Die Zytotoxizität von Adriamycin in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungsdauer in Kulturen asynchron wachsender chinesischer Hamsterzellen und menschlicher Nierenzellen

1) Experimentell nachzuprüfende Fragestellung und ihre Ableitung

Unter den verschiedenen Zytostatika spielen die Anthrazykline eine bedeutende Rolle in der Chemotherapie. Für die Versuche dieser Arbeit wurde Adriamycin (Abk.: ADM) verwendet, im Handel als Adriblastin bekannt. Adriamycin wird in der Klinik zur Behandlung eines sehr breiten Spektrums von Neoplasien verschiedener Histogenese und Hämoblastosen eingesetzt. Primäre Indikationen sind:

Akute lymphoblastische und myeloblastische Leukämie, maligne Lymphome vom Hodgkin- und non Hodgkin-Typ, Wilmstumor, Blasenkarzinom und Hodentumor, ferner Bronchial- und Mammakarzinome, Ewing Sarkom, Weichteil- und Knochensarkome, gynäkologische Tumoren und Schilddrüsenkarzinom (1, 7)

Versucht man die inzwischen sehr reichhaltige Literatur über Adriamycin zu sichten, so läßt sie sich nach mehreren Aspekten gliedern, und zwar nach Ergebnissen über die klinische Anwendung, Struktur- Wirkungsbeziehungen, pharmakokinetische und pharmakodynamische Fragen, Nebenwirkungen, insbesondere die für die Anthrazyklingruppe kennzeichnende Kardiotoxizität, (9)

den Wirkungsmechanismus auf molekularbiologischer Ebene; Zytotoxizität in Zellkulturen und - vergleichend - an experimentellen Tumorsystemen bei Tieren, sowie zu speziellen Fragen über Kanzerogenität und Mutagenität.

Greift man einen für die Grundlagenforschung zu diesem Pharmakon wichtigen Themenkomplex heraus, nämlich die Wirksamkeit von Adriamycin auf Zellkulturen in Abhängigkeit von verschiedenen Testparametern, so fällt auf, daß es wenig Untersuchungen darüber gibt. Die Arbeiten auf der Basis von Zellkulturen verfolgen meist speziellere Fragestellungen, etwa die einer möglichen Zellzyklus-spezifität, Wirkungsvergleiche mit anderen Substanzklassen an synchronisierten Säugetierzellen oder Vergleich der Wirkung auf ruhende und exponentiell wachsende Zellen.

Ausführlichere Arbeiten über die Effektivität von Adriamycin in Abhängigkeit von der Konzentration, Einwirkungszeit oder der Wirkungsvergleich zwischen zwei asynchron wachsenden Zelllinien sind kaum zu finden oder Teilergebnis in einer weiteren Fragestellung.

Infolgedessen kristallisierten sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen heraus, die in einzelnen Versuchsabschnitten zu klären waren:

- 1) Die Fähigkeit von Adriamycin, Zellen in ihrer Reproduktionsfähigkeit irreversibel zu schädigen, bei
- verschiedenen Konzentrationen
- steigenden Einwirkungszeiten von 4 bis 24 Stunden
- 2) Diese Beobachtungsmerkmale sollen an zwei asynchronen Zellkultursystemen geprüft werden, nämlich an
- Lungenfibroblasten chinesischer Hamsterzellen,

Zelllinie B-14-F-28 (Abk.: B-14) und
menschlichen Nierenzellen (Human Adult Kidney Cells;
Abk.: HAK)

- 3) In einem Block von Vorversuchen sollte geklärt werden,
inwieweit die Überlebensraten abhängig sind
- von der Anzahl der Spülungen mit Hanks'-Lösung
 - vom Alter des bei -18°C aufbewahrten Adriamycin
 - von der Inaktivierung des Medikaments durch
die Inkubation bei 37°C.

2) Material und Methoden

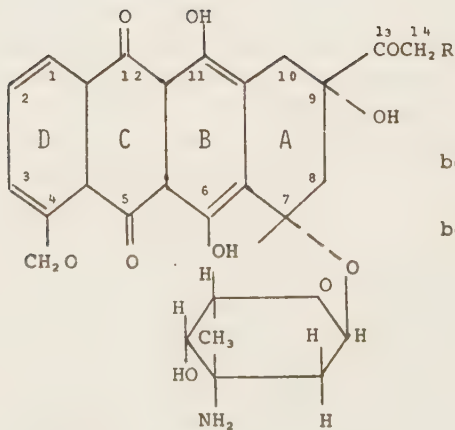
2.1) Das verwendete Zytostatikum

2.1.1) Die chemische Struktur und die physikalischen Grunddaten von Adriamycin

Adriblastin - Synonym: Doxorubicinhydrochlorid - ist ein Antibiotikum der Anthrazyklingruppe aus Kulturen von *Streptomyces peuceticus* var. *caesius*. Im folgenden sei die chemische Struktur von Adriamycin wiedergegeben:

(14)

Abb.: 1



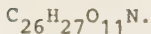
bei Daunomycin:

R = H

bei Adriamycin:

R = OH

Massenspektrometrische Daten führen zur Summenformel:

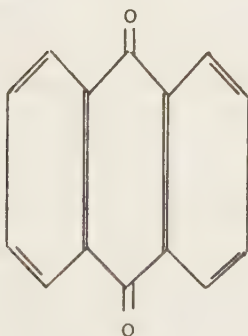


Die nomenklatorische Bezeichnung lautet:

(8S, 10S) - 10 - (3-Amino - 2,3,6- trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl) - oxy -8-glycolyl - 5,7,8,9,10,12-hexahydro - 6,8,11-trihydroxy - 1-methoxy-naphthacen -5,12-dion-hydrochlorid. (1)

Durch die saure Hydrolyse läßt sich das Molekül in das wasserunlösliche, rote Aglycon 14-Adriamycinon und den wasserlöslichen Aminozucker Daunosamin aufspalten. (2)

Abb.: 2



Anthrachinon Grundgerüst (11)

Der Aminozucker, die 2,3,6-trideoxy-3-Amino-L-lyxohexose ist bisher noch in keinem Naturprodukt gefunden worden. Das Aglycon und die Aminopyranose sind über eine β -1-7-Glykosidbindung verknüpft. Der aglykonische Bindungsanteil erfolgt dabei über die α -Stellung der Hydroxylgruppe an C₇. (14)

Von den physikalischen Eigenschaften ist Adriamycin, in der Form des Hydrochlorid, ein rot kristalliner Feststoff, der bei ca. 205°C schmilzt und bei 223-224°C zerfällt. (16, 2)

Lösungen von Adriamycinhydrochlorid nehmen bei sauren pH-Werten eine orange-gelbe, bei neutralem pH eine orange-rote und im basischen pH-Bereich - pH 9 - eine blau-violette Farbe an. (2)

Von der stereochemischen Struktur her ist Adriamycin der Vorgängersubstanz Daunomycin (Abk.: "DM") eng verwandt, es unterscheidet sich von ihm lediglich durch die Substitution des Wasserstoffatoms an C₁₄ durch eine Hydroxylgruppe. (15)

Auf die Struktur-Wirkungsbeziehung des Adriamycin wird in 6.1) näher eingegangen.

2.1.2) Zur Pharmakokinetik und -dynamik von Adriamycin

Entgegen einer früheren Arbeit von Di Fronzo und Mitarbeitern, derzufolge sich in Gewebsextrakten Adriablastin-behandelter Tiere kein Hinweis auf eine metabolische Veränderung fand, (12) wurden in jüngsten Veröffentlichungen im Gallensaft exponierter Malignompatienten bis zu acht Metaboliten nachgewiesen. (22, 26, 32) Von ihnen sind Adriamycinol und Adriamycinon am bekanntesten. Abhängig von der Methode - Spektrophotofluorometrie, Radioimmunoassay, Dünnschichtchromatographie - wurden unterschiedlich viele Metaboliten im Plasma, Urin und Gallensaft bestimmt.

Die Plasmaclearance von Adriamycin verläuft triphasisch mit Halbwertszeiten von 11 Minuten, 3 Stunden und 27 Stunden, wobei die ersten beiden Phasen einer schnellen Verteilungsphase zugerechnet werden. (26)

Der Adriblastinspiegel im Plasma fällt schneller als der seiner Metaboliten. In den Einzelphasen der Plasmaclearancekurve nimmt ihr Anteil nach 24 Stunden bis auf 90% der anfänglich verabreichten Dosis zu. Bei unbeeinträchtigter Leberfunktion folgen die einzelnen Kurvenabschnitte einer Reaktionskinetik erster Ordnung, (5) bei Lebermetastasen oder sonstigen Leberfunktionsstörungen gilt das nicht mehr, die Plasmakonzentrationen von Adriamycin und seinen Metaboliten liegen 4-5 mal höher als bei lebergesunden Patienten. Ebenso ist die Elimination des Zytostatikum und seiner Metaboliten stark verzögert. (26)

Auch im Blutstrom anderer Säugetiere, etwa dem Organismus von Mäusen - weibliche Schweizer Mäuse der Linie CD₁ (12) - sind nach 32 Stunden erst 50% einer verabreichten Adriamycinosis ausgeschieden. Die Metabolisierung von Adriblastin beginnt mit einer Reduktion der Carbonyl-Seitenkette an C₁₄ zu Adriamycinol durch die ubiquitär vorkommende Aldo-Keto-Reduktase. Beide Substanzen sind therapeutisch aktiv. Dieser Abbauschritt verläuft bei verschiedenen Säugetierspezies in unterschiedlichem Ausmaß. (32)

Die Spaltung der Glycosidbindung von Adriamycin und Adriamycinol führt zu hydrophoben Aglyconen, die durch Anlagerung von Sulfatgruppen oder Glucuronsäure ausgeschieden werden können. Darüberhinaus wurden weitere Abbauschritte durch Analyse von Metaboliten im menschlichen Urin gefunden. (32)

Die Ausscheidung erfolgt langsam über Niere und Leber, wobei beim Menschen in den ersten fünf Tagen - klinischen Studien zufolge - nach der Applikation nur 5% der Gesamtmenge über die Nieren ausgeschieden werden. (4, 14) Dieser Befund mag auf eine verlängerte Gewebsbindung von Adriblastin hinweisen. Beim Stoffwechselweg über die Leber werden 30% einer verabreichten Menge als Konjugate ausgeschieden, während 50% in die Galle abgegeben werden.

Adriamycin akkumuliert lange in verschiedenen Geweben und Organen wie Knochenmark, Niere und Lymphgewebe, wobei Maximalspiegel 24 Stunden nach dreimaliger Injektion einer Testdosis erreicht werden. (12)

Für weibliche CD₁ Mäuse liegt der Adriblastinspiegel 8 Stunden nach Applikation einer Dosis von 5 mg/KG in der Lunge bei 9, den Nieren bei 7, im Herz bei 5, der Milz bei 14, der Leber bei 9 und den Lymphknoten bei 8 relativen Einheiten. (12)

Bei 18 Malignompatienten wurden innerhalb von 5 Stunden nach einer i.v.-Bolus-Injektion von 30 mg Adriblastin/m² Körperoberfläche folgende Gewebsspiegel gemessen: Leber 2,7, Lymphknoten 2,6, Muskel 0,40, Knochenmark 0,5 sowie Fett bzw. Haut 0,2 µg Adriblastin/g Exzisionsgewebe. Die Gewebeproben wurden intraoperativ oder im Rahmen einer diagnostischen Probeexzision entnommen. (26)

Aus diesen pharmakokinetischen Befunden ist zu schließen, daß nach einmaliger Gabe von Adriblastin klinisch relevante Konzentrationen im normalen und malignen Gewebe von 1 - 2 Tagen aufrecht erhalten werden; aus diesem Grund wurden für die folgende Untersuchung (im Gegensatz zu Eichholtz) (19) Expositionszeiten in dieser Größenordnung gewählt.

2.2) Versuchsaufbau und -durchführung

2.2.1) Verwendete Zelllinien, Anlegen von Passagen und Zellkulturen

Zur Versuchsdurchführung wurden chinesische Hamsterzellen der Linie B-14-F-28 (Abk.: B-14) sowie HAK-Zellen verwendet, die seit vielen Jahren im strahlenbiologischen Institut kultiviert werden. B-14 Zellen sind fibroblastenähnlich und haben während des exponentiellen Wachstums eine Verdoppelungszeit von ca. 12 Stunden. (8)

Die Wachstumskurve beginnt mit einer lag-Phase von ca. 6 Stunden Dauer, in der sich die Zellen von der Trypsinwirkung erholen und am Glasboden anwachsen, dann erfolgt ein exponentieller Anstieg der Zellzahl über etwa 72 Stunden, danach verlangsamt sich die Wachstumsrate der Zellen wegen Erschöpfung des Nährmediums und wegen zunehmender Übervölkerung, so daß - im halblogarithmischen Maßstab - die lineare Kurve allmählich in ein Plateau abbiegt. (8)

Das Wachstumsverhalten der HAK-Zellen verläuft ähnlich, doch beträgt die Verdoppelungszeit in der log. Wachstumsphase ca. 24 Stunden, in der lag-Phase 48 Stunden.

Da eine neue Passage von B-14 Zellen jeden dritten, von HAK-Zellen jeden siebten oder achten Tag angelegt wurde, kamen in den Versuchen Zellen in der log. Wachstumsphase zur Anwendung. Wurde diese Zeitgrenze um mehr als einen Tag überschritten, war die Koloniebildungsfähigkeit deutlich herabgesetzt, da die Zellen mangels Nährstoffzuführung und der Dichte des Zellrasens in die Plateau-Phase übertraten, und offenbar auch nach Resuspendierung mit frischen Medium in ihrer Reproduktionsfähigkeit beeinträchtigt blieben. Das Anlegen einer neuen Passage lief für beide Zellstämme in folgenden Schritten ab:

- Die zuletzt angelegte Passage wurde nach Entnahme aus dem Brutschrank unter dem Auflichtmikroskop auf Kontamination mit Pilzkulturen und auf die Wachstumsdichte des Zellrasens überprüft.
- Das verbrauchte Medium wurde abgegossen und anschließend 5 ml einer Lösung A - Zusammensetzung siehe 2.3) - auf den Zellrasen gegeben. Dadurch sollen Ca^{2+} -Ionen herausgelöst werden, die das Trypsin hemmen.
- Nach 5 Minuten wurde Lösung A abgesaugt und 2 ml einer 2%igen Trypsinlösung über die Zellschicht pipettiert. Durch Andauung der Zellwände veränderte sich die Zellform, die Zellen lösten sich vom Flaschenboden ab und schwammen frei in der Lösung.
- Nach sieben Minuten Einwirkungszeit wurden durch mehrmaliges Durchpipettieren etwaige Zellverbände getrennt, evtl. noch am Glasboden haftende Zellen mit einem kunststoffüberzogenen Metallschaber gelöst.

Im Anschluß daran wurde die Zellsuspension mit Vollmedium im Verhältnis 1:10 versetzt, um auf diese Weise das Trypsin zu verdünnen und durch ein Substratüberangebot in seiner Wirkung zu stoppen.

- Unter einem binokularen Mikroskop wurde mit Hilfe der Zählkammer nach Bürker die Zellzahl bestimmt. Wird die Suspension vorher gut durchmischt, stellt das arithmetische Mittel der Zählung beider Felder der Zählkammer einen ausreichend genauen Wert dar. Im Zweifelsfall wurde der Auszählvorgang mit einer neu präparierten Kammer wiederholt.
- In G-20 Vierkantflaschen nach Schott (180 ml) wurden bei Passagen mit B-14 Zellen 100 000 bzw. 70 000, für HAK-Passagen 50 000 bzw. 30 000 Zellen pipettiert. Mit Eagles Minimum Essential Medium, dem 10% Kalbs serum zugesetzt worden war, wurde auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Bei den meisten Passagen liefen jeweils zwei Flaschen mit 200 Zellen Einsaat zur Ermittlung der Plating Efficiency (Abk.: "PE") mit. Die Flaschenhalse wurden abgeflammt und mit Alufolie verschlossen.

Für die jeweiligen Versuchsreihen wurde die 1:10 verdünnte Stammsuspension durch Verdünnungsreihen auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Um die PE-Kontrollwerte des Zellwachstums ohne Adriamycinzugabe für jeden Einzelversuch zu bestimmen, wurden zusätzlich zu den einzelnen Adriamycin-Konzentrationen vier Flaschen mit je 200 Zellen angelegt. Für jede in einem Versuch gewählte Konzentrationsstufe wurde ebenfalls ein Satz von vier Flaschen verwendet. Wurde bei hohen Konzentrationen eine geringe Überlebensquote erwartet, wurden entsprechend mehr Zellen in die Kulturgefäße eingesät.

Die Inkubationszeit - bei 37°C, einem pH von 7,2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit - betrug für B-14 Versuche sieben bis acht, für HAK-Zellen neun bis zwölf Tage. Wurde die Inkubationszeit unterschritten, waren die Zellklone entweder zu klein oder noch unzureichend ausgebildet, überschritt man die Bebrütungszeit, wuchsen die Kolonien zusammen oder schwammen während des Färbevorgangs ab, so daß Einzelbestimmungen mit hohen Fehlerquoten belastet waren.

2.2.2) Aufstellen der Versuchsansätze, Inkubationsbedingungen

Adriblastinhydrochlorid lag als rote kristalline Trockensubstanz in Ampullen zu je 2 mg vor. Die Lagerung erfolgte bei 4-5°C im Kühlschrank. Die Trockensubstanz wurde mit 2 ml sterilem aqua bidestillata aufgelöst und anschließend mit kalter Hanks'-Lösung über Verdünnungsreihen auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Pro Versuch wurden Portionen zu 0,5 ml mit einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml zur weiteren Verdünnung verwendet, die Restanteile unmittelbar nach dem Auflösen bei -18°C aufbewahrt. Mit Ausnahme der Lagerungsversuche waren die Adriamycinlösungen nie älter als eine Woche.

Adriamycinlösungen wurden vor Inkubationsbeginn zur Zellsuspension pipettiert!

In einem der drei Vorversuche sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß die Inkubationsbedingungen - 37°C, pH von 7,2 und 95% relative Luftfeuchtigkeit - während der Einwirkzeit von Adriamycin bis zu 24 Stunden die Aktivität des Zytostatikum mindern.

Hierzu wurde 1 ml Adriamycin mit 8 ml Medium in Vierkantflaschen pipettiert und jeweils, 0, 4, 8, 12, 16 und 24 Stunden vorinkubiert, bevor die entsprechend verdünnte

Zellsuspension zu je 1 ml hinzugefügt wurde, so daß sich eine Konzentration von 0,1 ug/mlx500 Zellen Einsaat ergab. Aus Praktikabilitätsgründen wurde diese Versuchseinheit in zwei Teilen ausgeführt, mit 0, 4, 6 und 8 Stunden Vorinkubation in einem Fall, und 0, 12, 16 und 24 Stunden im anderen Fall. Nach Ablauf dieser Zeitspannen wurden jeweils 500 Zellen pro Flasche eingesät und Adriamycin nach 4 Stunden Einwirkungsdauer auf die B-14 Zellen ausgewaschen.

Die Überlebensraten von Zellen, die mit frisch angesetztem Adriamycin behandelt und jenen, die mit unterschiedlich lange vorinkubiertem Adriamycin behandelt worden waren, wurden verglichen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Bei den Vorversuchen mit verschiedenen alten Adriamycinlösungen wurde die Aufbewahrungszeit von 7 - 9 Tagen als eine Woche, von 14 - 17 Tagen als zwei Wochen und von 21 Tagen als drei Wochen gerechnet.

Die Abhängigkeit der Überlebensrate von der Anzahl der Spülungen nach einer Mindesteinwirkungszeit von 4 Stunden wurde bestimmt, indem jeweils ein Satz von vier Flaschen 1x, 2x oder 3x mit 5 ml Hanks'-Lösung gespült wurde. Alle übrigen Versuche wurden je zwei Spülungen unterzogen, den Vierkantflaschen im Anschluß daran wieder 10 ml frisches Medium zugesetzt.

Für HAK- und B-14 Zellen hatte sich in Vorversuchen eine vierstündige Anwachszeit als notwendiges Minimum erwiesen, so daß die Mindesteinwirkungsdauer von Adriamycin sich über denselben Zeitraum erstrecken mußte, weil sonst durch Ausspülen noch locker haftende Zellen abgeschwommen wären. In den Hauptversuchen wurde Adriamycin nach Ablauf der vorgesehenen Expositionszeit ausgewaschen und die mit frischem Medium bedeckten Zellkulturen 7 - 8 bzw. 9 - 12 Tage inkubiert.

Die Versuchsreagenzien wurden, von der Adriamycinverdünnung mit Hanks'-Lösung abgesehen, vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

2.2.3) Färben und Auszählen der Zellkolonien

Nach Ablauf der Inkubationszeiten war aus jeweils einer proliferationsfähigen Zelle eine Kolonie von mehr als 50 Zellen entstanden, die nach Färbung mit Methylenblau-Lösung mit bloßem Auge sichtbar war.

Das Anfärben der Zellkolonie erfolgte über 10-minütiges Einwirken von ca. 10 ml einer verdünnten alkalischen Methylenblau-Stammlösung. (Zubereitung siehe unter 2.3) Die Zellkolonien wurden unter einem binokularen Lupenmikroskop bei 4 - 8facher Vergrößerung ausgezählt, wobei nur eine Kolonie mit mehr als 50 Einzelzellen in die Zählung einging.

Jeder einzelne Versuch wurde genau protokolliert, u. a. mit Angabe von:

Zelllinie, Einsaat, Alter der Passage, Verdünnungsschritte von Adriamycin und den Zellsuspensionen, Zeitpunkt der Adriamycinzugabe, ermittelte Zellzahl in der Bürker-Kammer, Kennnummer und Datum der neuangelegten Passage sowie das Alter der verwendeten Adriamycinlösung.

2.2.4) Darstellung der Auswertungsmethoden und -prinzipien

Im folgenden werden zunächst die einzelnen Auswertungsmethoden und -prinzipien erwähnt; die Erklärung der statistischen Auswertungsverfahren und einiger für die Ergebnisinterpretation wichtiger Kenngrößen erfolgt entweder in 9.3) oder wird in die jeweiligen Kapitel eingearbeitet.

Vor Auswertung der Einzelergebnisse jedes Versuchs wurde die Auswertbarkeit geprüft. Waren in einer Versuchseinheit von vier Glasflaschen einer Konzentrationsstufe oder Kontrolle mehr als zwei verpilzt, blieben die

Restwerte unberücksichtigt. Unterschritten die Daten für die PE die 30%-Grenze, mußte der gesamte Versuch wiederholt werden. Bei den ersten Versuchen mit einer neuen Zelllinie wurden die Zellkulturen wenige Male zu früh aus dem Brutschrank genommen, so daß keine brauchbaren Zählergebnisse zustande kamen.

Ein weiteres Kriterium der Auswertbarkeit war die mittlere Koloniezahl. Durchschnittswerte unter fünf gelangten nicht zur Auswertung.

Gezählt wurden Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Als Überlebensrate wurde der Quotient der mittleren Koloniezahl aus behandelten und unbehandelten Zellen definiert. Multiplikation mit 100 ergab die Überlebensrate in Prozent.

Alle Versuche wurden mit jeweils vier Vierkantflaschen je Konzentrationsstufe ausgeführt und in der Regel dreimal, in wenigen Fällen zweimal wiederholt. Aus den Überlebensraten von jeweils vier Flaschen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

Die Mittelwerte der Überlebensraten dienten als Grundlage für eine in halblogarithmischer Darstellung gezeichnete Dosis-Effekt-Kurve.

Die gesamten Versuchsergebnisse mit Angabe der Einzelwerte sind im Anhang unter 9.2) zusammengefaßt; dabei ist auch das Alter der verwendeten Passage und die Einsaat angegeben. Es finden sich weiter Zusammenfassungen der Daten aus den einzelnen Versuchsabschnitten.

2.3) Die Zusammensetzung der Versuchsreagentien

- 1) Eagles Minimum Essential Medium mit Hanks'- Salzen
- 2) Hanks'-Lösung
- 3) Lösung A
- 4) Trypsinlösung
- 5) Färbelösung

Tabelle 1: Zusammensetzung und Herstellung des verwendeten Nährmediums

1) Die Nährlösung bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium + Hanks'-Salze in Pulverform. Eine Ampulle zu 10,7 g enthielt:

Zusammensetzung in mg/l

Zusammensetzung in mg/l

2) Hanks'-Salze:

NaCl	8000	KCL	400
Na ₂ HPO ₄ : 2H ₂ O	60	L-Methionin	15
KH ₂ PO ₄	60	L-Phenylalanin	32
MgSO ₄ : 7H ₂ O	200	L-Thyreonin	48
CaCl ₂ wasserfrei	140	L-Thryptophan	10
Glucose	1000	L-Thyrosin	36
Phenolrot	10	L-Valin	46
		Cholinchlorid	1
1) Eagle's Minimum Essential Medium:		Folsäure	1
		i-Inosit	2
		Nicotinamid	1
L-Arginin	105	D-Pantothensäure-Ca-Salz	1
L-Cystin	24	Pyridoxal HCL	1
L-Glutamin	292	Riboflavin	0,1
L-Histidin	31		
L-Isoleucin	52,5		
L-Leucin	52,4		
L-Lysin	58		
Thiamin HCL	1		

Der Inhalt einer Ampulle wurde mit 350 mg NaHCO_3 , 2 ml 1n NaOH und 100 mg Neomycinsulfat in einem Liter Aqua destillata gelöst und mittels einer Passage durch einen Bakterienfilter sterilisiert. Dem Medium wurden 10%, der Hanks'-Lösung 1% - bezogen auf das Flaschenvolumen - Kalbserum der Firma Gibko zugesetzt.

3) Lösung A:

NaCl:	8,33 g	
KCL:	0,40 g	
NaHCO_3 :	0,35 g	In einem Liter
$\text{Na}_2\text{HOP}_4 + \text{H}_2\text{O}$:	0,06 g	Aqua bidestillata
KH_2PO_4 :	0,06 g	gelöst.
Phenolrot als		
Indikator:	0,02 g	

pH-Wert der Lösung im Neutralbereich

4) Trypsinlösung:

Zusammensetzung wie Solution A + Zugabe von 2 g Trypsin der Firma Gibko

5) Färbelösung:

30 ml einer gesättigten alkoholischen Methylenblau-Lösung
100 ml Aqua destillata.

1 ml 1%ige KOH

3) Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus den Vorversuchen

3.1) Abhängigkeit der Überlebensrate vom Alter der Adriamycinlösung

In einer Einführungsarbeit zu Adriamycin von Arcamone et al. findet man den Hinweis, daß die Aktivität wäßriger Adriamycinlösungen über einen Monat unverändert bliebe, sofern eine Lagertemperatur von 5°C nicht überschritten werde. Bei höheren Temperaturen oder bei sauren bzw. alkalischen pH-Werten der Lösung hingegen sei die Wirksamkeit vermindert. (2)

Da für die Versuchsdurchführung nur Lösungen des Medikaments verwendet werden durften, deren zytostatische Aktivität durch die Lagerdauer unbeeinträchtigt geblieben war, sollte die Literaturangabe experimentell nachgeprüft werden.

Hierzu wurden Adriamycinportionen zu 0,5 ml ca. ein, zwei und drei Wochen vor Versuchsbeginn bei -18°C eingefroren, am Versuchstag bei Zimmertemperatur aufgetaut und auf Konzentrationen von 0,1 und 0,01 ug/ml verdünnt. Die Überlebensraten dieser Versuchsansätze wurden mit denen für frische, am Versuchstag angesetzte Lösungen verglichen.

Die Überlebensraten in Tabelle 2 für jeweils gleiche Aufbewahrungszeiten schwanken für beide Konzentrationsstufen z.T. relativ stark um den Gruppenmittelwert. Die große Streubreite bei 0,1 ug/ml ist auf zwei Werte mit frischer Adriblastinlösung und einen Einzelwert, der mit einer acht Tage gelagerten Adriamycincharge gewonnen wurde, zurückzuführen, ohne daß diese "Ausreißer" erklärt werden können.

Eine gleichsinnige Tendenz der Überlebensraten mit steigender Lagerdauer im Sinne einer Zunahme ist, auch innerhalb nur einer Versuchsreihe, nicht festzustellen. Die Unterschiede in den Überlebensraten für die einzelnen Zeitabschnitte und für beide Konzentrationen sind auf dem 5%-Niveau nicht signifikant.

Die Prüfung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und ergab H-Werte von 5,35 ($c = 0,01 \text{ ug/ml}$) und 2,04 ($c = 0,1 \text{ ug/ml}$).

Tabelle 2: Überlebensrate für verschieden lange gelagertes Adriamycin bei den Konzentrationen $0,01 \text{ ug/ml}$ und $0,1 \text{ ug/ml}$ (in % der p.e.)
1 Woche = 7 - 9 Tage, 2 Wochen = 14 - 17 Tage,
3 Wochen = 21 Tage

Konz.:	Lagerdauer:			Kontrolle: (= p.e.)
	frisch	1 Wo	2 Wo	3 Wo
0,1	34,6	40,8		74,3
0,1	25,2		6,8	36,9
0,1	5,7	13,4		10,2 39,8
0,1	5,3		5,4	5,1 33,3
0,1	4,1	6,1		45,6
$\bar{x}$	15,0	20,1	6,1	7,7
s	14,0	18,2	1,0	3,6
,01	79,9	72,1		74,3
,01	100		98,6	36,9
,01	70,4	70,2		57,4 39,8
,01	89,7		69,8	55,2 33,3
$\bar{x}$	85,0	71,2	84,2	56,3
s	12,7	1,3	20,3	1,6

Für die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bedeutet dies: Im Testzeitraum von drei Wochen verändert sich die Aktivität von Adriblastin nicht signifikant, eine Beeinflussung der Überlebensraten kann bei den in den Hauptversuchen verwendeten Lösungen - maximal eine Woche Lagerung - als unwahrscheinlich gelten.

3.2) Abhängigkeit der Ergebnisse von der Anzahl der Spülungen

Nach Ablauf einer festgelegten Einwirkungszeit von vier Stunden wurde Adriamycin mit 5 ml Hanks'-Lösung ein-, -zwei- oder dreimal ausgewaschen und nach einer einwöchigen Inkubationszeit wurden die Überlebensraten der Kulturen bestimmt.

Die Daten in Tabelle 3 lassen ähnliche Tendenzen wie bei den Lagerungsversuchen erkennen, doch liegen die Durchschnittswerte einer Versuchsreihe ungefähr im selben Größenbereich, d.h. die Streuung der Werte hält sich in den für biologische Testsysteme gewohnten Grenzen, was für beide Konzentrationen von 0,1 und 0,05 µg/ml gilt, wenngleich zwischen den einzelnen Versuchsreihen deutlichere Schwankungen auftreten.

Die Datengruppe für jede Spülung setzt sich aus vier Einzelwerten zusammen. Bei der statistischen Auswertung mit dem Kruskal-Wallis-Test ergab sich auch in diesem Fall keine Signifikanz, der H-Wert betrug Null.

Damit hat gemäß der Nullhypothese die Anzahl der Spülungen keinen Einfluß auf die Überlebensrate.

In den Haupt- wie in den Vorversuchen wurde Adriamycin in jeder Kultur einheitlich zweimal ausgewaschen.

3.3) Der Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die Überlebensrate

Größeres Augenmerk wurde auf eine mögliche Veränderung der Adriamycinaktivität durch die Inkubationsbedingungen selbst gelegt, zumal das Pharmakon dabei bis zu 24 Stunden Temperaturen von 37°C und einem pH von 7,2 ausgesetzt war, was u. U. zur Instabilität der applizierten Adriamycinlösung führen könnte.

Tabelle 3: Überlebensrate in Abhängigkeit von der Anzahl der Spülungen mit Hanks'-Lösung bei $c = 0,1 \text{ ug/ml}$ und $c = 0,05 \text{ ug/ml}$

Konzentration	Anzahl der Spülungen			Kontrolle
	1x	2x	3x	
0,1/500	2,6	2,3	3,4	76,8
0,1/500	34,9	12,7	22,0	61,4
0,1/500	8,5	13,6	12,7	32,6
0,1/500	8,0	10,1	7,1	81,5
$\bar{x}$	13,5	9,7	11,3	
s	14,5	5,1	8,1	
0,05/500	58,4	50,8	37,9	95,0
0,05/500	20,6	13,0	16,9	60,6
0,05/500	52,0	62,3	62,8	57,2
0,05/500	25,3	32,8	25,6	81,5
$\bar{x}$	39,1	39,7	35,8	
s	18,9	25,7	20,0	

Um zu untersuchen, wie sich die Effektivität des Medikaments in Abhängigkeit von der Zeit verändert, wurde 1 ml Adriamycin der Konzentration 0,1 ug/ml mit 8 ml Medium in folgenden Zeitstufen bei 37°C vorinkubiert: 0 - 6 - 8 - 12 - 16 - 24 Stunden. Innerhalb der Wertegruppen bei den Kurzzeitinaktivierungsversuchen scheinen sich die Überlebensraten, vor allem bei 4 und 6 Stunden, nicht zu verändern, während bei den langen Inaktivierungszeiten die Überlebensraten deutlich ansteigen.

Dies würde auf eine Minderung der Adriamycinwirksamkeit durch die Brutschranktemperatur hinweisen. Bei der Berechnung der Regressionsgeraden wurden die Werte für 4 und 6 Stunden zusammengefaßt, weil sich ihr Mittelwert und ihre Standardabweichung nicht unterscheiden. Hiermit lautet die Regressionsgleichung:

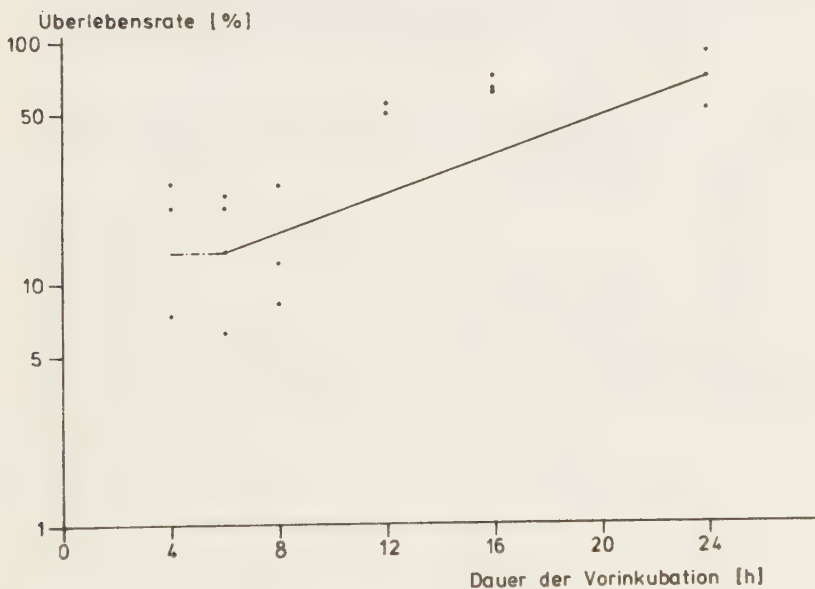
$\text{Log (sfr \%)} = 0,04t + 0,9$. (Abb. 1) sfr % = Überlebensfraktion;

Berechnet man weiterhin die Fläche unter der Regressionsgeraden, die als Konzentrations-Zeit-Produkt aufgefaßt werden kann, im Intervall zwischen 6 und 24 Stunden und dividiert diesen Flächenwert durch das Integrationsintervall von 18 Stunden, so erhalten wir einen Faktor, mit dem die Inaktivierung des Adriamycin durch die Temperatur abgeschätzt werden kann:

$$\begin{aligned} \text{ct}/2 = F &= \int_{t=6}^{24} c dt = 60 \text{ cm}^2; c = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Susp.volumen}} \\ &= \text{Überlebensrate} \end{aligned}$$

Abbildung 1

Einfluß der Inkubationsdauer auf die Wirksamkeit von Adriamycin; getestete Zeiten 0, 4, 6, 8, 12, 16, und 24 Stunden bei einer konstanten Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Testsystem B-14 Zellen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Überlebensrate aus vier Vierkantflaschen dar, wobei jeder Wert dreimal wiederholt wurde.



$F/18 = C = 3,3$; C sei der Korrekturfaktor;

Soll Adriamycin also nach 24 Stunden dieselbe Wirksamkeit wie nach 4 Stunden Inkubationszeit haben, so müßte man die Konzentration zu Versuchsbeginn um den Faktor 3,3 erhöhen, in diesem Fall von 0,1 ug/ml auf 0,33 ug/ml.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Überlebensrate von der Dauer der Adriamycin-Vorinkubation bei einer Konzentration von $c = 0,1$ ug/ml

Konz.: c/Ein- saat	Dauer der Vorinkubation						Kontrolle:
	4 ^h	6 ^h	8 ^h	12 ^h	16 ^h	24 ^h	
0,1/500	7,4	6,3	8,3				76,8
0,1/500	26,8	23,4	12,1				81,4
0,1/500	20,8	20,8	25,8				60,6
0,1/500				50,7	63,4	53,2	95,0
0,1/500				----	72,8	90,9	64,5
0,1/500				56,1	65,2	73,4	72,5
$\bar{x}$	18,1	16,8	15,4	53,4	67,1	72,5	
s	9,1	9,2	9,2	3,8	5,0	18,9	

$\bar{x}_{G/4-6} : 17,4$

$s_{4-6} : 8,5$

4) Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus den Hauptversuchen

4.1) Exposition von B-14 Zellen gegenüber Adriamycin über 4 - 8 - 24 Stunden

Das Hauptziel dieser Versuchsreihen bestand darin, mit B-14 und HAK-Kulturen Konzentrations-Zeit-beziehungen zu ermitteln und sie einander gegenüberzustellen. Beide Zelllinien wurden abgestuften Adriamycinkonzentrationen über 4 - 8 - 24 Stunden ausgesetzt. Die Maxima und Minima der Konzentration, bei denen die Versuche auswertbar waren, lagen zwischen 0,01 - 0,6 ug/ml.

Bei 4 Stunden zeigen die B-14 Zellen im gesamten Konzentrationsbereich kontinuierlich abnehmende Einzelwerte, deren Streuung im erwarteten Schwankungsbereich liegt. (siehe Tabelle 5)

Die Regressionsgleichung lautet:

$$\text{Log (sfr. \%)} = - 12,0c + 1,9.$$

Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,93 kann ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Überlebensraten und der Konzentration angenommen werden; es handelt sich also um eine Exponentialfunktion.

(Abb. 2)

Läßt man Adriamycin 8 Stunden auf B-14 Zellen einwirken, so nehmen auch hier die Überlebensraten mit steigender Konzentration kontinuierlich ab. Die Konzentrationen für Adriblastin liegen zwischen 0,01 - 0,1 ug/ml.

Die Gleichung für die Regressionsgeraden ergibt sich zu:
 $\text{Log (sfr. \%)} = - 13,6c + 1,9$; der Korrelationskoeffizient $- r -$ beträgt 0,82. (Abb. 3)

Auch bei 24 Stunden Expositionszeit nimmt die Überlebensrate der B-14 Zellen exponentiell ab, wenngleich die Inaktivierung durch einen größeren Steigungskoeffizienten der Regressionsgeraden als in den vorhergehenden Versuchen mit 4 und 8 Stunden Einwirkungsdauer vor sich geht:

$\text{Log (sfr. \%)} = - 21,8c + 2,0$, r beträgt 0,92. (Abb. 4)

Vergleicht man den Steigungsfaktor der Regressionsgeraden in Abhängigkeit von der Expositionszeit, so zeigt sich, daß mit steigender Einwirkungszeit die Wirksamkeit von Adriblastin auf B-14 Zellen bei vergleichbaren Konzentrationen zunahm. Charakterisiert man die Überlebensrate durch eine D_0 , die Dosis, die im geradlinigen, also exponentiellen Teil der Kurve die Zahl der jeweils noch überlebenden Zellen auf $1/e$ vermindert, (27) so ergeben sich für alle drei Inkubationszeiten verschiedene Werte, nämlich: 0,083, 0,075, 0,046 $\mu\text{g/ml}$.

Abbildung 2

Der Einfluß steigender Adriamycinkonzentrationen auf die Überlebensrate von B-14 Zellen bei 4 Stunden Einwirkungs-
dauer von Adriamycin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert
der Überlebensrate aus vier Vierkantflaschen dar, wobei
jeder Wert mindestens dreimal, bei $c = 0,025$ und $0,15 \mu\text{g/ml}$
zweimal wiederholt wurde. Die Gerade wurde aus der Regres-
sionsgleichung $\text{Log (sfr. \%)} = - 12,0c + 1,9$ berechnet.

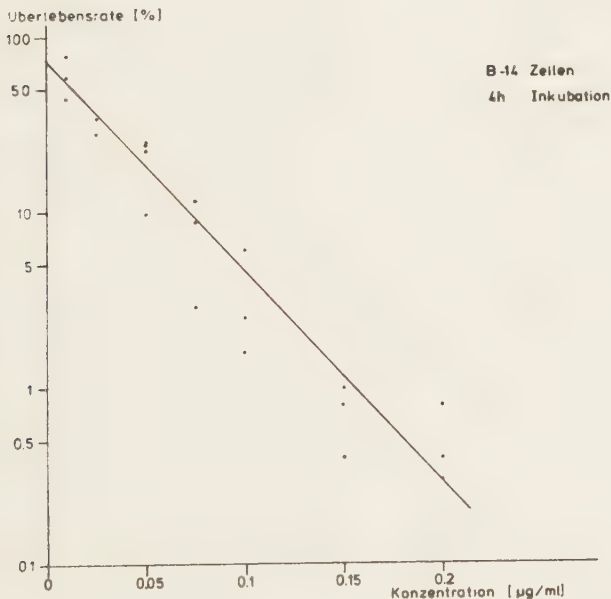


Abbildung 3

Der Einfluß steigender Adriamycinkonzentrationen auf die Überlebensrate von B-14 Zellen bei 8 Stunden Einwirkungsdauer von Adriamycin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Überlebensrate aus vier Vierkantflaschen dar, wobei jeder Wert mindestens dreimal, bei $c = 0,015$, $0,035$ und $0,075$ $\mu\text{g/ml}$ zweimal, bei $c = 0,10$ $\mu\text{g/ml}$ nur einmal bestimmt wurde. Die eingezeichnete Gerade wurde aus der Regressionsgleichung $\text{Log (sfr. \%)} = -13,6c + 1,9$ berechnet.

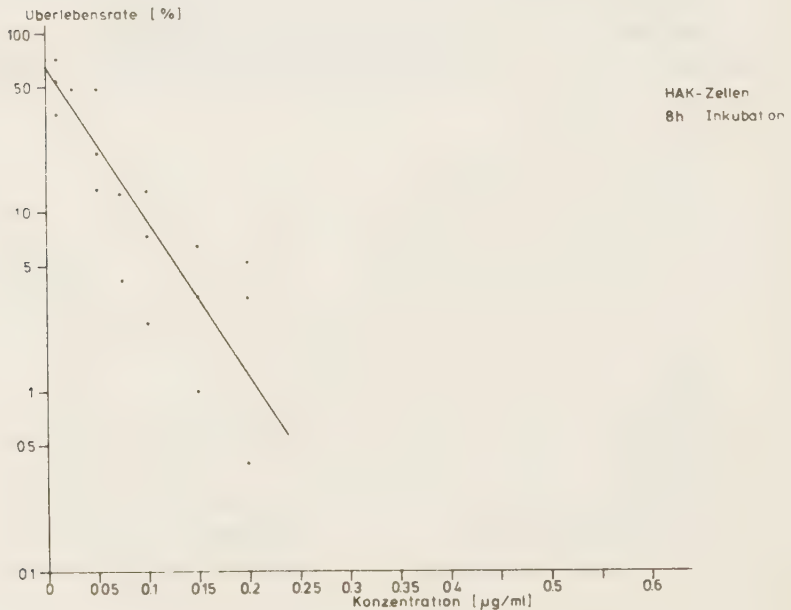


Abbildung 4

Der Einfluß steigender Adriamycinkonzentrationen auf die Überlebensrate von B-14 Zellen bei 24 Stunden Einwirkungs-
dauer von Adriamycin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Überlebensrate aus vier Vierkantflaschen dar, wobei jeder Wert mindestens dreimal, bei $c = 0,015$ und $0,035$ $\mu\text{g/ml}$ zweimal, bei $0,075$ $\mu\text{g/ml}$ nur einmal bestimmt wurde. Die eingezeichnete Gerade wurde aus der Regressionsgleichung $\text{Log (sfr. \%)} = - 21,8c + 2,0$ berechnet.

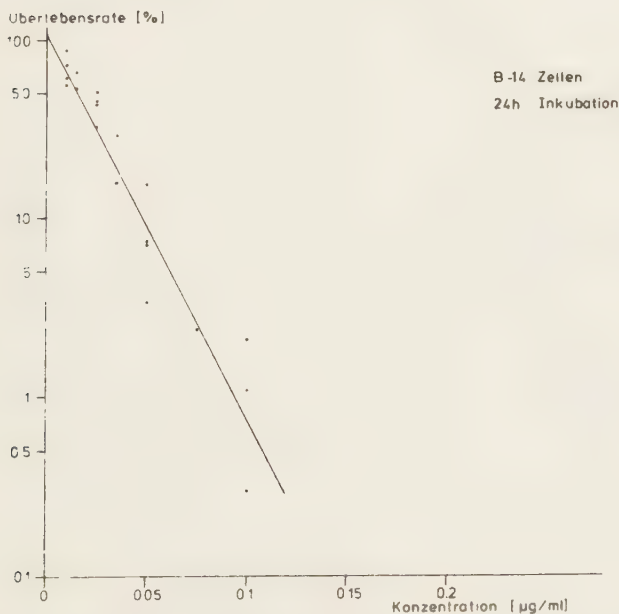


Tabelle 5:

Zusammenfassung der Daten für 4 Stunden Einwirkungsdauer
Zelllinie: B-14

c in ug/ml	Überlebensrate in Prozent				Kontrolle			
	1	2	3	4	1	2	3	4
0,01/500	59,8	78,4		44,8	61,1	73,1		54,6
0,025/500	34,5			28,2	61,1			54,6
0,050/500	24,8	22,8	25,0	9,8	61,1	73,1	63,4	54,6
0,075/500	11,7	8,8		2,9	61,1	73,1		54,6
0,1/500/1T.	2,5		6,1	1,6	61,1		63,4	54,6
0,15/2T.	0,8			1,0	61,1			54,6
0,20/5T.	0,3	0,8		0,4	61,1	73,1		54,6
0,30/2T.		0,2				73,1		
	$\bar{x}$	s						
0,01	61,0	16,8						
0,025	31,4	4,5						
0,050	20,6	7,3						
0,075	7,8	4,5						
0,10	3,4	2,4						
0,15	0,9	0,1						
0,20	0,5	0,3						

Tabelle 6:

Zusammenfassung der Daten für 8 Stunden Einwirkdauer

Zelllinie: B-14

c in ug/ml	Überlebensrate in Prozent				Kontrolle			
	1	2	3	4	1	2	3	4
0,01/500	45,3	52,2	54,7	58,1	78,3	43,9	47,1	39,4
0,015/500		58,7	45,9			43,9	47,1	
0,025/500	11,7	33,1	36,4		78,3	43,9	47,1	
0,035/500		29,3	23,2			43,9	47,1	
0,050/500								
/2T.		13,4	18,9	7,1		43,9	47,1	39,4
0,075/500								
/5T.		4,1	12,3			43,9	47,1	
0,10/2T.								
/5T.			6,2				47,1	
	$\bar{x}$	s						
0,010	52,6	5,4						
0,015	52,3	9,1						
0,025	27,1	13,4						
0,035	26,3	4,2						
0,050	13,1	5,9						
0,075	8,2	5,8						
0,10	6,2	----						

Tabelle 7:

Zusammenfassung der Daten für 24 Stunden Einwirkdauer

Zelllinie: B-14

c in ug/ml	Überlebensrate in Prozent					Kontrolle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0,01/500	87,2	72,3		56,1	61,4	78,8	87,8		48,8	49,8
0,015/500				66,2	53,8				48,8	49,8
0,025/500		32,5	51,1	44,7	43,5		87,8	47,3	48,8	49,8
0,035/500				29,3	15,9				48,8	49,8
0,050/500	7,1	3,4	15,6	7,2	2,9	78,8	87,8	47,3	48,8	49,8
0,075/2T.				2,4					48,8	
0,10/5T.	0,3		2,1	1,1		78,8		47,3	48,8	
	$\bar{x}$	s								
0,010	69,3	13,7								
0,015	60,0	8,8								
0,025	43,0	7,7								
0,035	22,6	9,5								
0,050	7,2	5,1								
0,075	2,4	----								
0,10	1,2	0,9								

Zusammenfassend läßt sich sagen: B-14 Zellen werden bei Einwirken abgestufter Adriamycinkonzentrationen nach einer Exponentialfunktion inaktiviert, die in einem halblogarithmischen Koordinatensystem durch eine Regressionsgerade wiedergegeben werden kann. Mit zunehmender Expositionsdauer nimmt die Wirksamkeit der gleichen Konzentration zu.

4.2) Exposition von HAK-Kulturen gegenüber Adriamycin über 4 - 8 - 24 Stunden

Ein Überblick über die Einzelergebnisse unter Verwendung von HAK-Zellen als Testsystem macht zunächst auf niedrigere Einsaaten aufmerksam, die erforderlichlich waren, einmal, weil die gebildeten Zellkolonien kompakter und größer als die der B-14 Zelllinie waren, zum anderen, weil sich die HAK- im Vergleich zu den B-14 Zellen als weniger sensitiv erwiesen. Um bei hohen Adriblastinkonzentrationen noch auswertbare Ergebnisse zu erhalten, erwies sich eine obere Einsaatgrenze von 2000 Zellen als sinnvoll, im mittleren Konzentrationsbereich bei 500, im unteren ab 0,025 ug/ml bei 200 Zellen. Zum Teil deutlich niedriger als bei den B-14 Versuchen fielen die Werte für die PE aus, die in knapp der Hälfte der Fälle unter 40% lagen, in einem Versuch sogar bei 26,3%.

Zum Kurvenverlauf im einzelnen:

Läßt man Adriblastin 4 Stunden auf HAK-Zellen einwirken, so bedarf es im Vergleich zu B-14 Zellen höherer Konzentrationen, um die entsprechenden Überlebensraten zu erzielen. (siehe Tabelle 8)

Die Überlebensraten nehmen mit steigender Konzentration ab, ungewöhnliche Abweichungen einzelner Meßwerte treten nicht auf. Für die Werte bei 4 Stunden Einwirkdauer läßt sich folgende Regressionsgleichung berechnen:

$\text{Log (sfr. \%)} = - 3,4c + 1,8$. Der Wert des Korrelationskoeffizienten von 0,91 läßt auf einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Überlebensraten und der Konzentration schließen. (Abb. 5)

Läßt man Adriamycin 8 Stunden auf HAK-Zellen einwirken, so zeigt sich in der graphischen Darstellung wie auch im tabellarischen Vergleich (siehe Tabellen 8 und 9) ein schnelleres Absinken der Überlebensraten als bei 4 Stunden, ablesbar auch am unterschiedlichen Steigungsfaktor der Regressionsgeraden:

$\text{Log (sfr. \%)} = - 8,6c + 1,8$. (Abb. 6)

Ein völlig anderes Bild zeigen die Meßwerte bei 24 Stunden Adriamycinexpositionsdauer. Nach zunächst steilem Abfall der Überlebensquoten bis zur Konzentrationsstufe 0,035 ug/ml verzögert sich die Inaktivierung der HAK-Zellen im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 - 0,15 ug/ml sehr deutlich. Demnach ließe sich das Verhalten der Überlebenskurve bei 24 Stunden durch eine biphasische Kurve beschreiben mit einer schnellen Inaktivierung bei relativ niedrigen Adriamycinkonzentrationen und einer flachen Geraden im Bereich hoher Konzentrationen.

Für den steilen wie für den flachen Kurvenanteil kann durch Berechnung der Korrelationskoeffizienten bzw. ihr Quadrat von 0,08 bzw. 0,94 von einer linearen Beziehung zwischen Überlebensraten der HAK-Zellen und der Adriamycinkonzentration ausgegangen werden.

Die zugehörigen Regressionsgleichungen lauten für den flachen Kurvenanteil: $\text{Log (sfr. \%)} = - 11,8c + 1,9$ (Abb. 7), für den steilen Kurvenanteil: $\text{Log (sfr. \%)} = - 29,8c + 2,0$ (Abb. 7).

Die D_0 für den steilen Abschnitt ergibt sich zu 0,03 ug/ml.
Für den Kurvenverlauf bei 4 und 8 Stunden sind die Werte
für D_0 0,29 bzw. 0,12 ug/ml.

4.3) Vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 8:

Zusammenfassung der Daten für 4 Stunden Einwirkdauer

Zelllinie: HAK

c in ug/ml	Überlebensrate in Prozent			Kontrolle		
	1	2	3	1	2	3
0,01/200	80,4	43,2	66,2	31,1	46,9	66,1
0,025/200	77,8	53,6	65,6	31,1	46,9	66,1
0,050/500	45,7	36,2	43,6	31,1	46,9	66,1
0,075/500	54,0			31,1		
0,10/500	31,5	18,2	16,3	31,1	46,9	66,1
0,15/500						
/2T.	13,3	9,2	20,5	31,1	46,9	66,1
0,20/2T.	5,9	7,1	12,4	31,1	46,9	66,1
0,40/2T.		2,2	2,0		46,9	66,1
0,60/2T.		1,1	1,1		46,9	66,1

0,010	63,3	18,8
0,025	65,7	12,1
0,050	41,8	5,0
0,075	54,0	----
0,10	22,0	8,3
0,15	14,3	5,7
0,20	8,5	3,5
0,40	2,1	0,1
0,60	1,1	0,0

Tabelle 9:

Zusammenfassung der Daten für 8 Stunden Einwirkdauer
Zelllinie: HAK

c in ug/ml	Überlebensrate in Prozent			Kontrolle		
	1	2	3	1	2	3
0,01/200	73,4	55,6	35,8	67,1	26,3	68,4
0,025/500	50,0			67,1		
0,050/500	49,7	21,7	13,5	67,1	26,3	68,4
0,075/500		12,9	4,2		26,3	68,4
0,10/1T.	13,1	7,4	2,4	67,1	26,3	68,4
0,15/1T.						
" /2T.	6,5	3,4	1,0	67,1	26,3	68,4
0,20/2T.	5,3	3,3	0,4	67,1	26,3	68,4
	$\bar{x}$	s				
0,01	54,9	18,8				
0,025	50,0	----				
0,050	11,2	5,8				
0,075	8,6	6,2				
0,10	7,6	5,4				
0,15	3,6	2,8				
0,20	3,0	2,5				

Tabelle 10:

Zusammenfassung der Daten für 24 Stunden Einwirkungsdauer
Zelllinie: HAK

c in ug/ml	Überlebensrate in Prozent			Kontrolle		
	1	2	3	1	2	3
0,01/200	52,3	52,4	51,8	77,9	37,9	38,4
0,025/500	8,6	21,3	29,3	77,9	37,9	38,4
0,035/500	3,3	11,5	20,8	77,9	37,9	38,4
0,050/500			16,7			38,4
0,10/2T.			7,9			38,4
0,15/2T.			1,1			38,4

	$\bar{x}$	s
0,010	52,2	0,3
0,025	19,7	10,4
0,035	11,9	8,8
0,050	16,7	----
0,10	7,9	----
0,15	1,1	----

Abbildung 5

Der Einfluß steigender Adriamycinkonzentrationen auf die Überlebensrate von HAK-Zellen bei 4 Stunden Einwirkungsdauer von Adriamycin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Überlebensrate aus vier Vierkantflaschen dar, wobei jeder Wert dreimal, bei $c = 0,075 \mu\text{g/ml}$ nur einmal bestimmt wurde. Die eingezeichnete Gerade wurde aus der Regressionsgleichung $\log(\text{sfr. \%}) = -3,4c + 1,8$ berechnet.

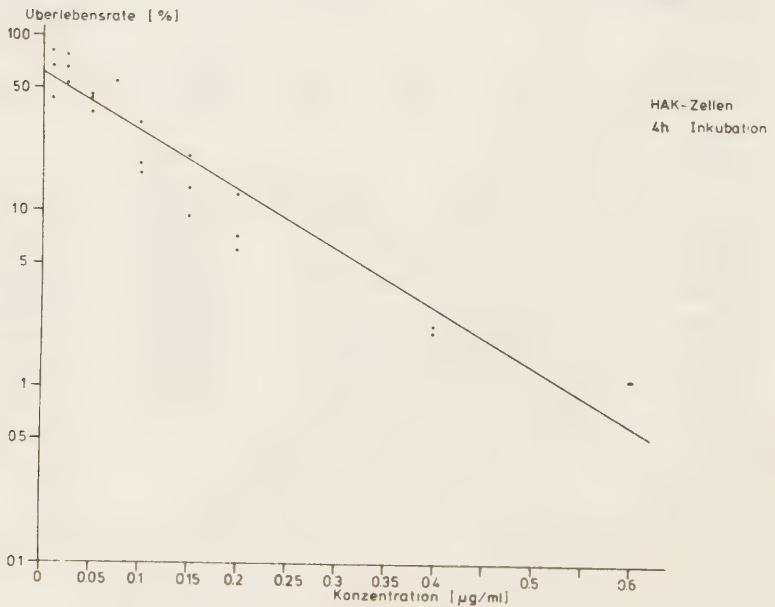


Abbildung 6

Der Einfluß steigender Adriamycinkonzentrationen auf die Überlebensrate von HAK-Zellen bei 8 Stunden Einwirkungsdauer von Adriamycin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Überlebensrate aus vier Vierkantflaschen dar, wobei jeder Wert dreimal, bei $c = 0,075$ $\mu\text{g/ml}$ zweimal, bei $c = 0,025$ $\mu\text{g/ml}$ nur einmal bestimmt wurde. Die eingezeichnete Gerade wurde aus der Regressionsgleichung $\log(\text{sfr. \%}) = -8,6c + 1,8$ berechnet.

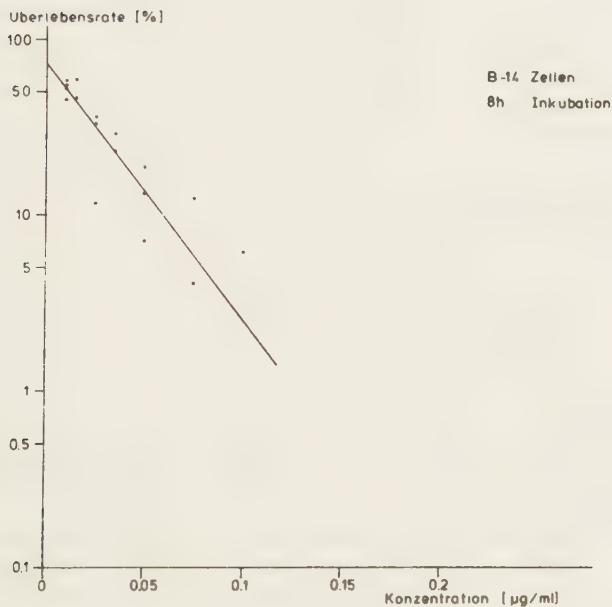


Abbildung 7

Der Einfluß steigender Adriamycinkonzentrationen auf die Überlebensrate von HAK-Zellen bei 24 Stunden Einwirkungsdauer von Adriamycin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Überlebensrate aus vier Vierkantflaschen dar, wobei jeder Wert dreimal, bei $c = 0,050$, $0,10$ und $0,15 \mu\text{g/ml}$ nur einmal bestimmt wurde. Die eingezeichnete Gerade wurde aus der Regressionsgleichung $\log(\text{sfr. \%}) = -29,8c + 2,0$ bzw. $-11,8c + 1,9$ berechnet.

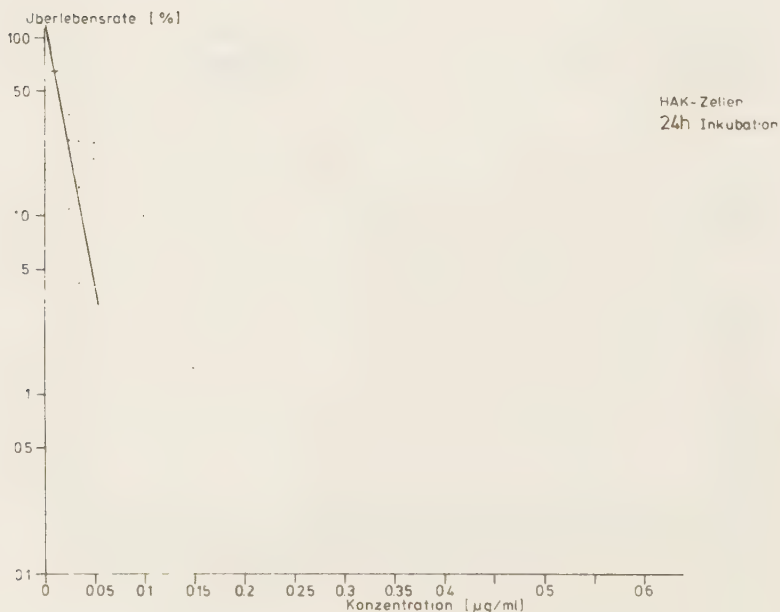
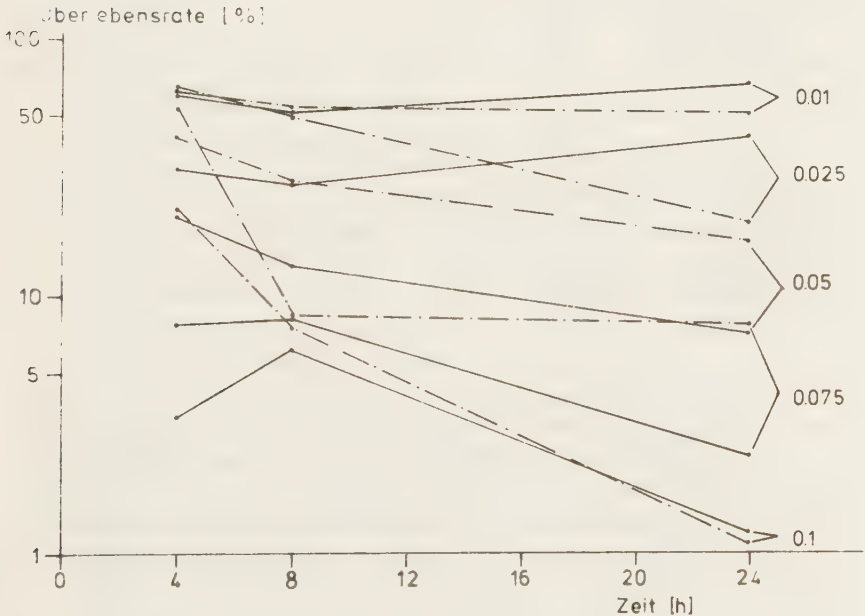


Abbildung 8

Vergleich der Antwort (=Überlebensrate)-Zeit-Beziehung zwischen B-14 und HAK-Zellen für folgende Konzentrationen: 0,01, 0,025, 0,050, 0,075 und 0,10 $\mu\text{g/ml}$. Jeder Punkt stellt den Gesamtmittelwert der Überlebensraten aus den Einzelmittelwerten von vier Vierkantflaschen für die jeweilige Konzentrationsstufe dar.



In allen Versuchsabschnitten kann für den gewählten Konzentrationsbereich ein monophasischer, exponentieller Kurvenverlauf für das Verhalten der Überlebensraten mit steigender Adriamycinkonzentration angenommen werden. Im Gegensatz zu allen anderen Überlebenskurven nehmen die HAK-Zellen bei 24 Stunden Expositionszeit nach einem biphasischen Kurvenbild mit einem steilen und einem flachen Geradenteil ab. Der exponentielle Kurvenverlauf wird durch die errechneten Korrelationskoeffizienten und deren Varianz belegt.

4.4) Die Ergebnisse der Dreifachen Varianzanalyse bzgl. der Signifikanz der Beobachtungsmerkmale

Die Untersuchungen in den Hauptversuchen hatten primär die Erstellung von Dosis-Antwort-Beziehungen bei verschiedenen Einwirkzeiten zum Ziel. Die Grundstruktur dieser Experimente setzte sich dabei aus drei unabhängigen und einer abhängigen Variablen zusammen. Zu den unabhängigen Variablen zählten die Konzentrationsstufen, die Dauer der Inaktivierung durch das Zytostatikum und die Testung mit verschiedenen Zelllinien, während Auswirkungen durch Variation eines dieser Merkmale durch die Überlebensrate, der unabhängigen Variablen, dokumentiert wurden. Die Frage, ob die Unterschiede in den Ergebnissen durch Veränderung eines, einer Kombination von zwei oder drei Merkmalen signifikant sind, sollte mit Hilfe einer Dreifachen Varianzanalyse geklärt werden. Im folgenden seien die Ergebnisse wiedergegeben; dabei zeigt der Rechneraus-

druck das größtmögliche Signifikanzniveau auf, demzufolge eine Verschiedenheit der Einzelmerkmale oder Merkmalskombinationen behauptet werden kann. Die Abkürzungen bedeuten im einzelnen:

Z = Zelllinie, K = Konzentration von Adriamycin (zum Vergleich wurden folgende Konzentrationen herangezogen: 0,01; 0,025; 0,050; 0,075; 0,10 ug/ml);

I = Inkubationszeit = Einwirkdauer von Adriamycin,

F = Wert der F-Verteilung;

Unabhängige Variable:	Freiheitsgrade:	F-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit
Z	1	12,78	0,001
I	2	12,70	0,000
K	4	60,92	0,000
ZI	2	10,84	0,000
ZK	4	2,56	0,050
IK	8	1,33	0,253
ZIK	8	2,09	0,055

Diese Ergebnisse lassen folgende Aussage zu:

Die Modifikation einer Variablen allein, gleichgültig, ob das die Einwirkdauer, die gewählte Zelllinie oder die Konzentrationsstufen sind, führt in allen Fällen zu signifikanten Unterschieden der Überlebensraten, die bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% liegen.

4.5) Antwort-Zeit-Beziehungen zwischen B-14 und HAK-Zellen bei jeweils konstanter Konzentration

Bei den bisher durchgeführten Einzelversuchen wurde unter Zeit- und Zelllinienkonstanz jeweils die Abhängigkeit der Überlebensquote von der Konzentration ermittelt und die Regressionsgeraden in ein Überlebensrate-Konzentrations-Koordinatensystem eingetragen.

Nummehr sollte geprüft werden, welchen Einfluß der Zeitfaktor auf den Verlauf der Überlebenskurve von B-14 und HAK-Zellen nimmt.

Dabei wurden die Mittelwerte ausgewählter Konzentrationen für beide Zelllinien über die Expositionszeiten von 4 - 8 und 24 Stunden tabellarisch zusammengestellt (siehe Tabelle 11) und in einem halblogarithmischen Koordinatensystem dargestellt. (Abb. 8)

Es wurden Konzentrationen gewählt, für die in allen Zeitstufen und für beide Zelllinien die Überlebensraten bestimmt worden waren, wobei einige Meßwerte nur einfach vorlagen. Dies sind folgende Konzentrationen:

0,01, 0,025, 0,050, 0,075 und 0,10 ug/ml.

Allgemein läßt sich aus Abbildung 8 ersehen, daß die Überlebensquoten beider Zelllinien mit steigender Expositionszeit abnehmen, lediglich bei B-14 Zellen ist in zwei Fällen, nämlich bei $c = 0,01$ und $0,025$ ug/ml eine Zunahme der Überlebensrate zwischen 8 und 24 Stunden zu beobachten und in einem Fall, bei $c = 0,10$ ug/ml, zwischen 4 und 8 Stunden.

Das sind aber nur einige Werte bei wenigen Konzentrationsstufen, die am linearen Verlauf der Überlebensraten, wie in der Diskussion der Hauptversuche gezeigt werden

konnte, über dem gesamten Konzentrationsbereich nichts ändern.

Aus der graphischen Darstellung ist weiterhin die geringere Reaktivität der HAK-Zellen über die gesamte Expositionszeit abzulesen und zwar in allen Konzentrationsstufen. Generell kann nicht behauptet werden, daß die Unterschiede in den Überlebensraten zwischen 8 und 24 Stunden Inkubationszeit größer sind als zwischen 4 und 8 Stunden. Diese Feststellung kann für beide Zelllinien getroffen werden.

Auf Grund der Resultate der Dreifachen Varianzanalyse kann die Erhöhung der Expositionsdauer bei B-14 wie HAK-Zellen bei jeweils konstanter Adriamycinkonzentration zu einer signifikanten Verminderung der Überlebensraten führen.

Tabelle 11: Vergleich der Antwort-Zeit-Beziehungen zwischen B-14 und HAK-Zelllinien für folgende Konzentrationen:
0,01, 0,025, 0,050, 0,075, und 0,10 ug/ml

c in ug/ml	B-14			HAK		
	4	8	24	4	8	24
0,010	61,0	52,6	69,3	63,3	54,9	52,2
0,025	31,4	27,1	43,0	65,7	50,0	19,7
0,050	20,6	13,1	7,2	41,8	28,3	16,7
0,075	7,8	8,2	2,4	54,0	8,6	7,9
0,10	3,4	6,2	1,2	22,0	7,6	1,1

5) Diskussion der Resultate aus den Hauptversuchen mit Referenzliteratur

Vergleichbare Versuchsansätze wie in 4.1), 4.2) und 4.3) geschildert, finden sich in der Literatur nur vereinzelt, meist arbeiten die Autoren mit synchronisierten Zellkulturen z. B. zu Fragen einer möglichen Zellzyklusspezifität von Adriamycin oder der Wirkung auf die Nukleinsäure- oder Proteinsynthese oder zu Fragen eines Synergismus bei Zytostatikakombinationen mit verschiedenen Wirkungsmechanismen, Probleme, auf die in einem späteren Abschnitt eingegangen wird.

In einer Arbeit von Barranco, Gerner et al. wurden mit asynchron wachsenden Zellen aus Ovarialgewebe des chinesischen Hamsters (CHO-Cells) Dosis-Wirkungsbeziehungen in einem sehr breiten Konzentrationsbereich von 0 - 25 $\mu\text{g/ml}$ untersucht, (3) wobei, im Gegensatz zu dieser Arbeit, die Einwirkungsdauer nur bei einer Stunde lag. Die Versuchsbedingungen waren mit denen unserer Arbeit vergleichbar. (3)

Übereinstimmend mit den Schlußfolgerungen dieser Untersuchung wirkt Adriamycin in verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen - 0,01 $\mu\text{g/ml}$ - überaus toxisch auf CHO-Zellen. Der Verlauf der Kurve ist jedoch biphasisch. Die D_{50} für den sensitiven Populationsanteil beträgt 0,2 $\mu\text{g/ml}$; für die resistente Fraktion 9,4 $\mu\text{g/ml}$. Bei Konzentrationen von 25 $\mu\text{g/ml}$ wurden Überlebensraten bis in die Größenordnung von 0,01% ermittelt, (3) eine Möglichkeit, die mit unserem Testsystem nicht realisiert werden konnte.

Daß durch die Ergebnisse dieser Arbeit ein monophasischer Kurvenverlauf festgestellt wurde, ist mit der Konzentrationsobergrenze von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ für B-14 Zellen bei 4 Stunden Einwirkdauer zu erklären, da der zweite exponentielle Kurvenanteil in Barrancos Versuchen erst ab 5 $\mu\text{g/ml}$ zu ermitteln ist, so daß die verwendeten Zellen der asyn-

chronen Population bei Versuchsdurchführung in der log.- Wachstumsphase waren.

Der biphasische Kurvenverlauf der Überlebensrate wird durch Untersuchungen von Barranco und Novak bestätigt.

(4) Die Referenzschwellendosen lauten hier: 0,7 bzw. 6,4 ug/ml, als Testsystem dienten diesmal Plateauphasezellen. Zellen in dieser Phase sind weniger sensitiv als exponentiell wachsende.

Kim und Kim (1) erzielten bei Expositionszeiten bis zu 32 Stunden bei asynchronen Hela-Zellen eine erhebliche Verzögerung der Verdoppelungszeit - die Konzentrationen betrugen 0,01, 0,1 und 1,0 ug/ml - (25)

Während in Kims Versuchen Kontrollgruppen eine Verdoppelungszeit von 18 Stunden aufwiesen, (24) stieg die Zellzahl bei der kleinsten Konzentration über 12 Stunden zunächst leicht an, blieb aber dann unverändert. (25)

Bei 1,0 ug/ml war die Zellvermehrung nur mehr sehr schwach ausgeprägt. (3)

Bhuyan und Fraser haben gefunden, (6) daß Zellen in asynchronen Populationen von Fibroblasten chinesischer Hamsterzellen (Linie ATCC CCL 16) in der G_1 - und G_2 -Phase nur je 15% der Gesamtheit ausmachen und diese 15% bis zu Adriblastinkonzentrationen von 0,3 ug/ml weniger sensitiv als S- oder M-Phasezellen sind. Die Autoren geben ferner die Reihenfolge der Empfindlichkeit von Fibroblasten chinesischer Hamsterzellen (DON-Zellen) in den verschiedenen Zyklusphasen wie folgt an:

$S > G_1, M, G_2$ (6).

Kim und Kim stellten ebenfalls die größte Zytotoxizität während der S-Phase fest. (25)

Kim und Kim ließen Adriblastin in Konzentrationen zu 0,01, 0,05 und 0,1 ug/ml auf asynchron wachsende Hela-Zellen einwirken und erhielten bei 3 Stunden Exposition und 0,1 ug/ml eine Überlebensrate von 4 - 5%, bei

3 Stunden und 0,05 ug/ml von 30 - 35%, Daten die mit denen von B-14 Zellen bei 4 Stunden Expositionszeit vergleichbar sind. (25)

Eichholtz untersuchte bei B-14 und Hela-Zellen die Abhängigkeit der Überlebensrate von der Adriamycin-konzentration im Medium bei konstanter Expositions-dauer sowie von der Expositionszeit bei nunmehr gleich-bleibenden Konzentrationen.

Im Gegensatz zu unseren Versuchen, wirkte Adriamycin nur 30 - 240 Minuten auf die beiden Zelllinien ein, während die Konzentrationen des Zytostatikum um den Faktor 10 bis 15 höher gewählt wurden:

0,1 - 3,0 ug/ml.

Bei jeweils unveränderten Expositionszeiten und steigenden Konzentrationen nahmen die Überlebensraten der B-14 und Hela-Zellen exponentiell ab. Ein markanter Abfall der Überlebensquoten über zwei- bis drei Dekaden - von 1,0 - 0,001 - war bei Erhöhung der Konzentration bei allen Zeitstufen von 30 bis 240 Minuten zu beobachten. (19)

Wurden feste Konzentrationen von 0,1, 0,5 und 1,0 ug/ml gewählt, und die Expositionszeiten variiert, so verlief die Regressionsgerade für B-14 und Hela-Zellen bei einer Konzentration von 0,1 ug/ml relativ flach, die Geraden bei Konzentrationen von 0,5 und 1,0 ug/ml über das gesamte Expositionsintervall steiler (19).

Obwohl die Einwirkungszeiten für Adriamycin niedriger als in den Versuchen dieser Arbeit lagen, (4 - 24 Stunden) fielen die Überlebenskurven ähnlich wie in unseren Experimenten über einen Bereich von drei Dekaden ab. Dafür lagen die Adriamycinkonzentrationen im Medium 10 - 15 mal höher als in unseren Versuchen.

Im Vergleich zu den B-14 Zellen weisen die Überlebenskurven der Hela-Zellen bei variablen Expositionszeiten eine kleine Schulter mit einer Extrapolationszahl unter zwei auf. (19) Schulterkurven konnten dagegen in unserer Arbeit weder bei B-14 Zellen noch bei HAK-Zellen festgestellt werden.

Im Zusammenhang mit unseren relativ langen Inkubationszeiten von 4 - 8 und 24 Stunden sollte erwähnt werden, daß nach intrazellulärer Konzentrationsbestimmung von Adriamycin bei Eichholtz die intrazelluläre Konzentration bei Expositionszeiten über zwei Stunden nicht mehr zunimmt.

Man sollte freilich bedenken, daß Adriamycin, bezogen auf in vivo-Verhältnisse, lange in den meisten Körpergeweben zurückgehalten wird, (12) so daß Versuchsansätze mit geringen Konzentrationen, z. B. 1,0 ug/ml, und längeren Einwirkzeiten in vivo-Bedingungen vom Aspekt der Zytotoxizität besser imitieren.

6) Erklärungsmöglichkeiten für die zytozide Wirkung von Adriamycin durch das Interferenzmodell

Die Ursachen auf molekularbiologischer Ebene für die Adriamycinwirkung bei proliferationskinetischen Untersuchungen führen zunächst auf den Wirkungsmechanismus der Substanz, der eine DNA- und RNA-Synthesehemmung zur Folge hat. (14) Der Effekt auf die Proteinsynthese ist nach Kim und Kim (25) und Wang (31) nur sehr gering einzuschätzen, doch schließen die Ergebnisse der Arbeit Barrancos nicht aus, daß Adriamycin die Synthese oder die Struktur eines hypothetischen Teilungsproteins beeinflußt, da die Adriamycin-

induzierte Verzögerung ungefähr zum selben Zeitpunkt in G_2 geschieht wie die durch Puromycin, einem Syntheseblocker, bedingte. (3) Eine weitere Folge der DNA-Synthesehemmung ist die Funktionsbeeinträchtigung der DNA-Polymerase bzw. der DNA gesteuerten Transcription durch RNA-Polymerase. (17) Die Hemmung der Enzymaktivität ist konzentrationsabhängig. (31)

Da die eben beschriebenen Hemmwirkungen konzentrationsabhängig sind, seien die makromolekularen Vorgänge der Nukleinsäuresynthese-Hemmungen ausführlicher dargestellt.

Der Wirkungsmechanismus von Anthrazyklinantibiotika wie dem Adriblastin oder dem Daunomycin wird durch das Interkalationsmodell von Lermann erklärt (15):

Die Komplexbildung des Adriamycin mit DNA ist von bestimmten Molekülstrukturen der beiden Reaktionspartner abhängig:

Der Struktur des Zuckermoleküls Daunosamin, der basischen Gruppe des Aminozyckers (14) sowie der Carbonylgruppe der aglykonischen Seitenkette.

Die spezifischen Bindungsstellen des DNA-Moleküls, die mit Adriblastin reagieren, dürften wahrscheinlich dieselben für alle Derivate dieser Klasse von verwandten Substanzen sein. (15)

Damit eine Komplexbildung zwischen Adriblastin und DNA zustande kommt, muß zwischen zwei benachbarten Basenpaaren auf der DNA ein gewisser Mindestabstand überschritten werden, um eine normale Van-der-Waalsbindung herzustellen.

Als Folge davon entspiralisiert sich DNA, und es kommt zu einer Zunahme der Gesamtlänge der Doppelhelix um $3,4 \text{ \AA}$ pro interkalierendem Molekül.

Auf Grund einer Verallgemeinerung des Interkalationsmodells durch Paoletti und Le Pecq (28) findet unter und oberhalb der Interkalationsstelle eine Verdrehung des DNA-Moleküls statt, d. h. der Abstand zwischen zwei Orthophosphatgruppen vergrößert sich. Dadurch ist in gewissem Maße eine Veränderung des innermolekularen Bindungswinkels der beteiligten Seitengruppen möglich.

Dies äußert sich in der Zu- und Abnahme des Torsionswinkels im Sinne einer Spiralisierung oder Entspiralisierung. Der Entspiralisierungswinkel für Daunomycin - dem Adriamycinanalogon - beträgt auf der Basis viskosimetrischer Messungen nach dieser Angabe 4° und ist damit groß genug, um einen Interkalationsprozeß zu ermöglichen. (15)

Durch die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den negativ geladenen Orthophosphatgruppen, die zusammen mit der Desoxyribonukleose das Rückgrat der DNA bilden, wird das Makromolekül in einer fast völlig gedehnten Stellung gehalten. (15)

Verschiedene andere Testergebnisse legen nahe, daß der aromatische Molekülanteil keinen Kontakt mit dem hydrophoben polaren Lösungsmittel hat. Nach Röntgenstrukturuntersuchungen von Pigram und Mitarbeitern (zit. nach 15) liegt der Aminosuckeranteil von Daunomycin in einer stereochemisch vom DNA-Molekül gebildeten Mulde, wobei sich die hydrophoben Flächen der Basenpaare und das Pharmakon sehr stark überlappen. Die ionisierte Aminogruppe steht, abgesehen von einer Wasserstoffbrückenverbindung zwischen der C_9 -Hydroxylgruppe der DNA und der ersten Phosphatgruppe, in Wechselwirkung mit einem zweiten Phosphatanion. (15)

Der Interkalationsanteil, der den Komplex stabilisiert, besteht aus einer schwachen hydrophoben Stabilisierung

in Form einer losen Van-der-Waalsbindung. Diese wird aus den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückrats und dem interkalierenden Molekül gebildet. (15)

Aus der vorliegenden Information scheint die Hemmung der Funktion oder der Replikation des viralen Genoms die Bildung einer starken Bindung des Antibiotikums mit der Nukleinsäure zu erfordern; weiterhin ist dies, nach physiko-chemischen Studien zu urteilen, nur mit doppelsträngiger DNA möglich. (14) Die mangelnde Wirkung auf einsträngige DNA oder RNA, z. B. bei Viren, scheint deshalb eine Folge der Unfähigkeit von Daunomycin zu sein, - und entsprechend von Adriamycin - einen stabilen Komplex zu bilden.

Die Folgen des Interkalationsvorganges bewirken eine Hemmung der DNA-Reduplikationsfähigkeit über eine Inaktivierung oder Blockierung der DNA-Polymerase. Der molekulare Mechanismus ist bis heute noch nicht zufriedenstellend erklärt. Es gibt einige Hypothesen hierzu, eine davon wäre, daß die Doppelhelix - Aufbrechen der H_2 -Brückenbindungen zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen, lokaler Verlust der Tertiärstruktur etc. - durch Einlagerung des Adriamycinmoleküls stabilisiert wird. Dieselbe Annahme könnte man für die DNA - abhängige RNA - Polymerasereaktion treffen, obwohl in diesem Fall eine unterbundene Umkehrung der A-B Konformation der DNA zu erwägen wäre. Ebenso könnte durch die Verdrehung des DNA-Moleküls die Bindung der DNA-Polymerase verhindert werden. (15)

Unter der Annahme, daß DNA-Polymerase mit ihrer Aktivität an 3-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA-Segmente beginnt, die durch die Aktivität einer Replikationsnuklease geöffnet werden, und die sich entlang des einsträngigen Segments bewegen, könnte die Anwesenheit der interkalierenden Substanz und seine

Tendenz, die beiden Stränge der DNA zusammenzuhalten, diesen Prozeß unterbrechen. (14)

In Mäuse-L1210 Leukämiezellen tritt 50% Aktivitätshemmung des Enzyms bei 7,4 ug/ml Adriamycin ein, 50% Hemmung der RNA-Synthese erfolgt, wenn 1 Mol Daunomycin pro 62 - 100 DNA Nukleotidäquivalenten gebunden wird, (14) ein auf Adriamycin gewiß übertragbarer Wert, da die Assoziationskonstanten übereinstimmen.

(20) Dies entspricht einer externen Konzentration im Bereich von 1,18 - 2,18 ug/ml. Zur Hemmung der Nukleinsäure-synthese in Hela-Zellen genügen bereits Konzentrationen von 0,01 - 0,1 ug/ml, (25) d. h., daß im gewählten Konzentrationsbereich unserer Arbeit praktisch nur die Nukleinsäuresynthese beeinträchtigt wird. Damit wird auch die von Barranco beobachtete Sensitivität von Säugetierzellen in der frühen S-Phase erklärbar. (3)

Die kerngebundene RNA-Synthese scheint für die Daunomycin- und Adriamycinwirkung sensibler als extranukleoläre RNA zu sein. (14)

Eine Bindungsspezifität der Anthrazyklinantibiotika für eine Base oder bestimmte DNA-Sequenz kann nicht sicher beobachtet werden. (14) Einige Experimente zeigen allerdings, daß die Hemmung der DNA-Replikation und Transcription vom Gehalt an A-T Basenpaaren und der Anwesenheit alternierender A-T-Abschnitte auf denselben Strängen abhängt. (20)

Die selektive Hemmung der Virusreplikation durch exogen zugeführte Matrizenstränge zu RNA-Tumroviren erklärt sich aus der Blockierung der Aktivität der Reversen Transcriptase durch Adriblastin. Die exogen zugeführten Matrizen zeigen allerdings eine spezifische Wechselwirkung mit A-T Basenpaaren im Versuchssystem: Mit Poly (dA-dT) oder PolyrA. (dT).

Bietet man RNA-Tumorviren Polymere von dI und dC als Einzelstrang an, vermögen selbst Konzentrationen von 20 ug/ml Daunorubicin die RNA-Polymerase von MSV-Viren nicht zu hemmen. (20) Die höhere Sensitivität von Daunomycin und Adriamycin gegenüber poly d(A-T) Kopolymeren und ebenso der viralen Polymerasereaktion bestätigt die obigen Befunde über die bevorzugte Bindung dieser Substanzen an d(A-T). d(A-T) Basenpaare, d. h. an doppelsträngige DNA. (20)

Die Empfindlichkeit der DNA-Polymerasereaktion ist in vivo und in vitro verschieden. Um die Uracilinkorporation in Hela-Zellen zu 50% zu hemmen, beträgt das Verhältnis Daunomycin/DNA-Nukleotiden ungefähr 1:60 - 100 000 in vivo, während der entsprechende Quotient in vitro bei 1:5 für die RNA-Polymerase liegt. (20)

Wenn in Markierungsexperimenten in Gegenwart von Adriamycin oder Daunomycin die Inkorporation radioaktiv markierten Leucins gehemmt wird, so ist dies eher als Folgewirkung der Zytostatika auf die m-RNA-Synthese zu interpretieren, denn als Ausfall der ribosomalen RNA-Synthese. (15)

7) Zusammenfassung

Die Inaktivierung von B-14 und HAK-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase nimmt bei Expositionszeiten von 4 - 8 - 24 Stunden im Konzentrationsbereich von 0,01 - 0,6 $\mu\text{g/ml}$ nach einer exponentiellen Funktion ab. Die errechnete Kurve verläuft monophasisch, eine Schulter liegt nicht vor.

HAK-Zellen sind resistenter als B-14 Zellen. Grundsätzlich ist ein Vergleich zwischen Versuchsergebnissen aus in vitro Zellsystemen und in vivo Testkonzeptionen nur sehr begrenzt möglich, da die Wachstumshemmung eines Modelltumors von Einflußgrößen abhängt, wie z. B. der Organ- und Gewebeskonzentration von Adriamycin, der Histologie des Tumors, der Homogenität des histologischen Bildes, dem Verteilungsmuster und Anteil sensitiver und resistenter Zellen, dem Anteil proliferierender Zellen, der Plasmahalbwertszeit und Exkretionsrate, dem Ausmaß der Metabolisierung sowie von immunologischen Reaktionen, die in Zellkulturversuchen nicht nachgeahmt werden können. Auf einen Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Werten aus Tierversuchen an chemisch induzierten und transplantierten Modelltumoren wurde deshalb verzichtet.

Zellkulturen können wohl als erstes Testsystem zur Prüfung der Wirkung einer pharmakologisch aktiven Substanz und der für den Ergebnisverlauf signifikanten Einflußparameter herangezogen werden. Sie liefern Basisinformationen für die Vorbereitung entsprechender in vivo Versuchskonzeptionen, können diese aber selbst nicht ersetzen, sondern bilden mit ihnen vielmehr ein komplementäres Testsystem für eine Substanz von potentiell

klinischem Interesse bzw. für entsprechende zur klinischen Erprobung parallel laufende Begleit- und Grundlagenstudien.

8) Literaturübersicht

- 1: Adriblastin, Zytostatikum für die Mono- und Polychemotherapie,
Firmenprospekt der Montedison Farmaceutica GmbH
Deutschland, Merzhauserstr. 112, 7800 Freiburg
i. Br.
- 2: Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., and Spalla, C., 1969;
Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a New Antitumor Antibiotic from *S. peuceticus* var. *caesius*,
Biotechnology and Bioengineering 11, 1101 - 1110.
- 3: Barranco, S. C., Gerner, E. W., Burk, K. H., and Humphrey, R. M., 1973;
Survival and Cell Kinetic, Effects of Adriamycin on Mammalian Cells,
Cancer Research 33, 11 - 16.
- 4: Barranco, S. C., and Novak, J. K., 1974;
Survival Responses of Dividing and Nondividing Mammalian Cells after Treatment with Hydroxyurea, Arabinosylcytosine, or Adriamycin,
Cancer Research 34, 1616 - 1618.
- 5: Benjamin, R. S., Riggs, C. E., Bachur, N. R., 1973;
Pharmakokinetiks and Metabolism of Adriamycin in Man,
Clin. Pharmacol. Ther. 14, 592 - 600.

- 6: Bhuyan, B. K., and Fraser, T. J., 1974;
Cytotoxicity of Antitumor Agents in a Mammalian
Cell System,
Cancer Chemotherapy Reports, Part 1, 58, 149 -
155.
- 7: Blum, Ronald H., and Carter, Stephen K., 1974;
Adriamycin, A New Anticancer Drug with Signifi-
cant Clinical Activity,
Annals of Internal Medicine 80, 249 - 259.
- 8: Born, Reinhild, 1974;
Zellkinetische Untersuchungen an chronisch
hypoxischen Fibroblasten des chinesischen
Hamsters,
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
m.b.H. München, GSF-Bericht: B 542.
- 9: Carter, Stephen K., 1975;
Adriamycin - A Review,
Journal of the National Cancer Institute 55,
1265 - 1274.
- 10: Cavalli-Sforza, 1974;
Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik,
Gustav Fischer-Verlag Stuttgart.
- 11: Christian, Hans-Rudolf, 1974;
Chemie,
Diesterweg-Salle-Verlag, Frankfurt am Main.
- 12: Di Fronzo, G., Gambetta, R. A., and Lenaz, L. 1971;
Distribution and Metabolism of Adriamycin in Mice.
Comparison with Daunomycin,
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 16, 572 - 576.

- 13: Di Fronzo, G., Lenaz, L., Bonadonna, G., 1973;
Distribution and Excretion of Adriamycin in
Man,
Biomedicine 19, 169 - 171.

- 14: Di Marco, A., Arcamone, F., and Zunino, F., 1974;
Daunomycin (Daunorubicin) and Adriamycin
and Structural Analogues: Biological Activity
and Mechanism of Action,
In: Corcoran, J. W. and Hahn, F. F., (Eds.)
Antibiotics 3,
101 - 128, Springer-Verlag Berlin.

- 15: Di Marco, A., and Arcamone, F., 1975;
DNA Complexing Antibiotics: Daunomycin,
Adriamycin and Their Derivates,
Arzneimittelforschung 25, 368 - 375.

- 16: Di Marco, A., Gaetani, M., and Scarpinato, B.,
1969;
Adriamycin (NSC-123, 127): A New Antibiotic
with Antitumor Activity,
Cancer Chemotherapy Reports, Part 1, 53, 33 - 37.

- 17: Di Marco, A., 1973;
Interactions of Oncostatic Agents with Molecular
Mechanisms
Involved in Transformation and Proliferation,
2nd Meeting of the American Association
of Cancer Research, Heidelberg, 212 - 213.

- 18: Ehninger, E., Stocker, H.-J., Proksch,
B., Wilms, K., 1980;
Die Pharmakokinetik von Adriamycin und
Adriamycinmetaboliten,
Klinische Wochenschrift 58, 927 - 934.

- 19: Eichholtz - Wirth, H., 1980;
Dependence of the Cytostatic Effect of
Adriablastin on Drug Concentration and Exposure
Time in vitro,
British Journal of Cancer 41, 886 - 891.
- 20: Fifth New Drug Seminar, 1975;
Adriamycin,
Cancer Chemotherapy Reports, Part 3,6, 83 - 145.
- 21: Herman, E., Mhatre, R., Lee, J. P., Vick, J.,
and Waravdekar,
V. S., 1971;
A Comparison of the Cardiovascular Actions of
Daunomycin, Adriamycin and N-Acetyldaunomycin
in Hamsters and Monkeys,
Pharmacology 6, 230 - 241.
- 22: Hittelman, Walter, N., and Rao, Potu N., 1975;
The Nature of Adriamycin - induced Cytotoxicity
in Chinese Hamster Cells as Revealed by Premature
Chromosome Condensation,
Cancer Research 35, 3027 - 3035.
- 23: Immich, H., 1974;
Medizinische Statistik,
F. K. Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York.
- 24: Kimler, Bruce F., Schneidermann, Martin H.,
and Leeper, Dennis B., 1978;
Induction of Concentration-dependent Blockade
in the G₂-Phase of the Cell Cycle by Cancer
Chemotherapeutic Agents,
Cancer Research 38, 809 - 814.

- 25: Kim, S. H., and Kim, J. H., 1972;
Lethal Effect of Adriamycin on the Division
Cycle of Hela-Cells,
Cancer Research 32, 323 - 325.
- 26: Lee, Yeu-Tsu N., Chan, Kenneth K., Harris,
Phillip A., and Cohen, Jordan L., 1980;
Distribution of Adriamycin in Cancer Patients,
Tissue Uptakes, Plasma Concentration after
IV and Hepatic IA Administration,
Cancer 45, 2231 - 2239.
- 27: Lissner, Josef, Hug, Otto 1975;
Gegenstand Radiologie, Kompendium für den
ersten klinischen Studienabschnitt,
Ferdinand Enke-Verlag Stuttgart.
- 28: Paoletti, Jaques, Le Pecq, Jean-Bernard, 1971;
The Change of the Torsion of the DNA-Helix
Caused by Intercalation,
Biochemie 53, 972 - 996.
- 29: Rao, Potu N., Mahagoarkar, Suneeta, Freireich,
Emil J., Loo, Ti Li, and Gottlieb, Jeffery A.,
1975;
Schedule-dependent Synergistic Cytotoxicity of
Arabinofuranosyl-cytosine with Adriamycin or
3,6-Bis-(5-chloro-2-piperidinyl)-2,5 piperazi-
nedione in Cultured Cells,
Cancer Research 35, 2996 - 3000.
- 30: Überla, K., 1976;
Erläuterungen und Lernhilfen zum Gegenstands-
katalog,
Institut für Medizinische Informationsverarbeit-
ung und Biomathematik der Universität München

- 31: Wang, Jaw J., Chervinsky, David S., and Rosen, Jeffrey M., 1972;
Comperative Biochemical Studies of Adriamycin
and Daunomycin in Leukemic Cells,
Cancer Research 32, 511 - 515.
- 32: Wilkinson, Peter, M., 1978;
Clinical Pharmacology of Adriamycin,
Biomedical Press, 209 - 223.
-

9.) Zusammenstellung der Einzelergebnisse aus den
Haupt- und Vorversuchen

Vorbemerkungen:

Erklärung der Abkürzungen

n_1, n_2, n_3, n_4 :	Wert der gezählten Kolonien in den einzelnen Vierkantflaschen
$\bar{x}$:	Mittelwert aus n_{1-4}
s:	Standardabweichung mit $n - 1$ als Populationsgröße
sfr.:	Survival fraction, Überlebensrate; Angabe in % und mit dem Kontrollwert verrechnet
c:	Adriamycinkonzentration in ug/ml
n.g.w.:	<u>N</u> icht <u>g</u> ewertet, da zu kleiner Umfang der Einzelwerte
Bezgr.:	<u>B</u> ezugs <u>g</u> röße zur Berechnung der Überlebensrate: Quotient aus behandelten und unbehandelten Zellen in Prozent
v.p.!::	<u>v</u> erpilzt

Das Alter der Passage versteht sich in Tagen; nach dem Stichwort "Versuchseinheit" erfolgt eine kurze Angabe des durchgeführten Versuchs.

Versuchseinheit: Abhängigkeit der Überlebensrate von der Anzahl der Spülungen

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	157	177	144	174	163	15,4 81,5 Bezgr.:
0,1/500/1x	49	22	41	19	33	14,6 8,0
0,05/500/1x	107	91	100	114	103	9,8 25,3
0,1/500/2x	71	38	17	39	41	22,3 10,1
0,05/500/2x	126	135	122	152	134	13,3 32,8
0,1/500/3x	24	22	34	35	29	6,7 7,1
0,05/500/3x	95	89	87	147	105	28,5 25,6

- 64 -

Versuchseinheit: Abhängigkeit der Überlebensrate von der Anzahl der Spülungen

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 5 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	131	109	103	v.p.!	114	14,7 57,2 Bezgr.:
0,05/500/1x	145	145	188	117	149	29,3 52,0
0,05/500/2x	137	198	185	193	178	28,0 62,3
0,05/500/3x	172	175	177	195	180	10,4 62,8

Versuchseinheit: Abhängigkeit der Überlebensrate von der Anzahl der Spülungen

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.									
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.:		
0/200	120	123	124	118	121	2,8	60,6	Bezgr.:	
0,05/500/1x	63	64	62	61	63	1,3	20,6		
0,05/500/2x	50	51	30	28	40	12,4	13,0		
0,05/500/3x	49	56	46	54	51	4,6	16,9		

Versuchseinheit: Abhängigkeit der Überlebensrate von der Anzahl der Spülungen

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.									
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.:		
0/200	175	229	180	176	190	26,1	95,0	Bezgr.:	
0,05/500/1x	263	274	280	293	278	12,5	58,4		
0,05/500/2x	239	293	259	174	241	50,1	50,8		
0,05/500/3x	187	240	174	119	180	49,7	37,9		

Versuchseinheit: Abhängigkeit der Überlebensrate von der Anzahl der Spülungen

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 2 Einsaat: 100T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	152	183	136	143	154	20,7	76,8
0,1/500/1x	13	9	9	9	10	2,0	2,6
0,1/500/2x	10	20	5	v.p.!	12	7,6	2,3
0,1/500/3x	15	14	9	14	13	2,7	3,4
0,1/500/4x	18	16	9	10	13	4,4	3,5

Versuchseinheit: Abhängigkeit der Überlebensrate von der Anzahl der Spülungen

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	139	124	101	127	123	15,9	61,4
0,1/500/1x	82	100	149	96	107	29,2	34,9
0,1/500/2x	20	41	72	22	39	24,1	12,7
0,1/500/3x	100	57	58	54	67	21,9	22,0

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit vom Alter
der Adriamycinlösung; Aufbewahrung bei - 18°C.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 2 Einsaat: 500T.

c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.	Bezgr.:
0/200	61	56	58	91	67	16,5	33,3	
0,1/500 frisch	8	7	13	7	9	2,9	5,3	
0,01/200 "	60	49	87	43	60	19,5	89,7	
0,1/500 2 Wo.	9	7	10	10	9	1,4	5,4	
0,01/200 "	39	47	44	56	47	7,1	69,8	
0,1/500 3 Wo.	11	2	4	17	9	6,9	5,1	
0,01/200 "	62	17	36	32	37	18,7	55,2	

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit vom Alter
der Adriamycinlösung; Aufbewahrung bei - 18°C.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	73	79	74	93	80	8,7 39,8 Bezgr.:
0,1/500 frisch	8	6	10	21	11	6,7 5,7
0,01/500 "	150	130	157	123	140	16,1 70,4
0,1/500 1 Wo.	22	28	27	30	27	3,4 13,4
0,01/500 "	122	121	140	176	140	25,0 70,2
0,1/500 3 Wo.	20	7	23	31	20	10,0 10,2
0,01/500 "	95	125	109	128	114	15,3 57,4

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit vom Alter
der Adriamycinlösung; Aufbewahrung bei - 18°C.

Zelllinie: B-14		Alter der Passage: 3				Einsaat: 100T.	
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	56	112	66	61	74	25,8	36,9
0,1/500 frisch	45	49	48	44	47	2,4	25,2
0,01/500 "	183	190	189	176	185	6,5	100,0
0,1/500 2 Wo.	13	16	7	14	13	3,9	6,8
0,01/500 "	182	180	190	176	182	5,9	98,6
0,1/500 4 Wo.	4	11	13	14	11	4,5	5,7
0,01/500 "	154	247	256	238	249	8,1	134,8

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit vom Alter
der Adriamycinlösung; Aufbewahrung bei - 18°C.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	126	158	147	163	149	16,4	74,3
0,1/500 frisch	118	155	76	165	129	40,4	34,6
0,01/500 "	297	325	306	260	297	27,3	79,9
0,1/500 4 T.	38	50	57	62	52	10,4	14,0
0,01/500 "	240	318	322	227	304	43,6	82,0
0,1/500 1 Wo.	183	142	160	120	131	26,8	40,8
0,01/500 "	251	298	229	293	286	33,3	72,1

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit vom Alter
der Adriamycinlösung; Aufbewahrung bei - 18°C.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	102	81	101	81	91	11,8	45,6
0,1/500 frisch	10	14	8	5	9	3,8	4,1
0,1/500 1 Wo.	10	14	8	9	10	2,6	4,5
0,1/500 2 Wo.	20	14	12	10	14	4,3	6,1

Versuchseinheit: Vorinkubation von Adriamycin; "Langzeit-
versuche"; c = 0,1 ug/ml

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	136	166	157	121	145	20,3 72,5 Bezgr.:
0,1/500/0 ^h	33	36	27	36	33	4,2 9,1
0,1/500/12 ^h	238	191	230	212	218	20,9 60,1
0,1/500/16 ^h	254	249	235	254	248	9,0 68,4
0,1/500/24 ^h	292	229	284	294	275	30,8 75,8

Versuchseinheit: Vorinkubation von Adriamycin;
"Kurzzeitversuche"; c = 0,01 ug/ml.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	120	118	123	124	121	2,8 60,6 Bezgr.:
0,1/500/0 ^h	10	14	18	18	15	3,8 5,0
0,1/500/4 ^h	62	64	83	91	75	14,3 24,8
0,1/500/6 ^h	37	76	93	95	75	26,9 24,8
0,1/500/8 ^h	82	122	84	70	90	22,5 29,5

Versuchseinheit: Vorinkubation von Adriamycin;
"Kurzzeitversuche" c = 0,1 ug/ml.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	172	178	138	163	163	17,6 81,4 Bezgr.:
0,1/500/0 ^h	50	42	55	38	46	7,1 11,4
0,1/500/4 ^h	145	198	111	107	140	42,1 34,5
0,1/500/6 ^h	123	133	139	127	131	1,0 32,1
0,1/500/8 ^h	74	89	86	110	90	15,0 22,1

Versuchseinheit: Vorinkubation von Adriamycin;
"Langzeitversuche"; c = 0,1 ug/ml.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	175	229	180	176	190	26,1 95,0 Bezgr.:
0,1/500/0 ^h	108	118	128	82	109	19,8 22,9
0,1/500/12 ^h	333	279	297	269	295	28,2 62,0
0,1/500/16 ^h	400	368	347	363	370	22,2 77,8
0,1/500/24 ^h	347	339	287	241	304	49,4 63,9

Versuchseinheit: Vorinkubation von Adriamycin;
"Kurzzeitversuche" c = 0,1 ug/ml.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	x	s	sfr.
0/200	152	183	136	143	154	20,7	76,8 Bezgr.:
0,1/500/0 ^h	10	20	5	4	12	7,6	2,3
0,1/500/4 ^h	37	36	33	40	37	2,9	9,5
0,1/500/6 ^h	18	9	28	77	33	30,3	8,6
0,1/500/8 ^h	54	30	34	41	40	10,5	10,4

Versuchseinheit: Vorinkubation von Adriamycin;
"Langzeitversuch"; c = 0,1 ug/ml.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	107	124	158	127	129	21,2	64,5 Bezgr.:
0,1/500/0 ^h	105	72	38	v.p.l	12	33,5	22,2
0,1/500/12 ^h	307	314	342	244	301	41,2	93,4
0,1/500/16 ^h	284	282	221	229	254	33,7	78,8
0,1/500/24 ^h	293	344	281	281	300	30,0	92,9

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

c/Einsaat	Zelllinie: HAK				Alter der Passage: 8		Einsaat: 50T.	
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.	Bezgr.:
0/200	70	69	59	51	62	9,0	31,1	
0,010/200	56	46	50	48	50	4,3	80,4	
0,025/200	40	51	53	50	49	5,8	77,8	
0,050/500	77	77	78	54	72	11,7	45,7	
0,075/500	72	83	81	100	84	11,7	54,0	
0,10/500	59	42	48	47	49	7,2	31,5	
0,15/2T.	105	53	98	76	83	23,5	13,3	
0,20/2T.	38	54	23	33	37	12,9	5,9	

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: HAK		Alter der Passage: 5			Einsatz: 50T.		
c/Einsatz	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	72	118	90	95	94	18,9	46,9
0,010/200	30	41	35	56	41	11,3	43,2
0,025/200	61	42	50	48	50	7,9	53,6
0,050/500	113	72	87	68	85	20,4	36,2
0,1/500	48	38	53	32	43	9,5	18,2
0,15/500	16	32	27	11	22	9,7	9,2
0,2/2T.	90	87	51	38	67	26,0	7,1
0,4/2T.	15	13	19	34	20	9,5	2,2
0,6/2T.	16	9	9	9	11	3,5	1,1

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: HAK		Alter der Passage: 7			Einsaat: 30T.		
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	122	111	132	164	132	22,8	66,1
0,01/200	98	96	80	76	88	11,1	66,2
0,025/200	89	82	84	92	87	4,6	65,6
0,050/500	99	177	152	149	144	32,7	43,6
0,10/500	18	14	88	96	54	44,0	16,3
0,15/500	36	27	104	104	68	42,0	20,5
0,20/2T.	217	229	88	123	164	69,5	12,4
0,40/2T.	28	29	9	41	27	13,2	2,0
0,60/2T.	21	10	20	4	14	8,2	1,1

Bezgr.:

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 8 Stunden

Zelllinie: HAK Alter der Passage: 10 Einsaat: 30T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	139	128	130	140	134	6,1	67,1 Bezgr.:
0,010/200	93	94	97	110	99	7,9	73,4
0,025/500	192	150	165	164	168	17,6	50,0
0,050/500	140	166	147	214	167	33,4	49,7
0,10/1T.	120	119	51	63	88	36,4	13,1
0,15/2T.	89	101	71	v.p.!	87	15,1	6,5
0,20/1T.	82	70	51	80	71	14,2	5,3

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 8 Stunden

Zelllinie: HAK Alter der Passage: 6 Einsaat: 50T.							
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s	sfr.
0/200	57	52	49	v.p.!	53	4,0	26,3 Bezgr.:
0,010/200	33	20	38	26	29	7,9	55,6
0,050/500	15	45	23	31	29	12,8	21,7
0,075/500	4	11	25	33	17	11,4	12,9
0,10/1T.	17	20	8	--	20	10,3	7,4
0,15/1T.	12	10	5	21	9	3,6	3,4
0,20/2T.	4	19	26		18	9,5	3,3

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 8 Stunden

Zelllinie: HAK Alter der Passage: 4 Einsaat: 60T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s sfr.
0/200	143	136	121	147	137	11,4 68,4 Bezgr.:
0,010/200	38	55	40	63	49	12,0 35,8
0,050/500	77	35	36	37	46	20,5 13,5
0,075/500	19	19	7	13	15	5,7 4,2
0,10/1T.	9	23	27	8	17	9,7 2,4
0,15/1T.	3	7	7	10	7	2,9 1,0
0,20/2T.	6	9	2	5	6	2,9 0,4

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: HAK Alter der Passage: 7 Einsaat: 50T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	s sfr.
0/200	69	90	77	67	76	10,4 37,9
0,010/200	46	36	40	37	40	4,5 52,4
0,015/200	35	29	16	22	26	8,3 33,6
0,025/500	38	39	37	48	41	5,1 21,3
0,035/500	25	18	31	13	22	7,9 11,5

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: HAK Alter der Passage: 7 Einsaat: 30T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	153	176	152	142	156	14,4 77,9 Bezgr.:
0,010/200	88	86	66	86	82	10,4 52,3
0,025/500	23	51	26	v.p.!	33	15,4 8,6
0,035/500	17	12	10	12	13	2,9 3,3

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: HAK Alter der Passage: 5 Einsaat: 50T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	74	75	72	86	77	6,3 38,4 Bezgr.:
0,010/200	35	43	40	41	40	3,4 51,8
0,025/500	57	66	46	v.p.!	56	10,0 29,3
0,035/500	44	50	28	38	40	9,4 20,8
0,050/500	39	31	30	28	32	4,8 16,7
0,10/2T.	55	71	58	59	61	7,0 7,9
0,15/2T.	5	10	3	16	9	5,8 1,1

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit von der
Einwirkdauer bei $c =$ konstant; $c = 0,05$ ug/ml

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n_1	n_2	n_3	n_4	$\bar{x}$	sfr.
0/200	155	166	168	108	150	28,3 74,8 Bezgr.:
0,05/500 16^h	19	23	63	94	50	35,6 13,4

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit von der
Einwirkdauer bei $c =$ konst. = 0,05 ug/ml.

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 2 Einsaat: 500T.						
c/Einsaat	n_1	n_2	n_3	n_4	$\bar{x}$	sfr.
0/200	154	159	185	167	166	13,6 83,1 Bezgr.:
0,050/1T. 16^h	302	256	317	374	312	48,7 37,6

Versuchseinheit: Überlebensrate in Abhängigkeit von der
Einwirkdauer bei $c = \text{konst.} = 0,05 \text{ ug/ml.}$

Zelllinie: B-14		Alter der Passage: 3			Einsaat: 100T.	
c/Einsaat	n_1	n_2	n_3	n_4	$\bar{x}$	sfr.
0/200	129	161	169	186	161	23,9 80,6 Bezgr.:
0,050/1T. 16 ^h	195	226	188	219	207	18,3 25,7

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: B-14		Alter der Passage: 3			Einsaat: 100T.	
c/Einsaat	n_1	n_2	n_3	n_4	$\bar{x}$	sfr.
0/200	109	125	103	100	109	11,1 54,6 Bezgr.:
0,01/500	89	113	149	138	122	26,8 44,8
0,025/500	92	74	66	76	77	10,9 28,2
0,050/500	29	22	23	33	27	5,2 9,8
0,075/500	6	15	6	5	8	4,7 2,9
0,10/500	7	4	1	5	4	2,5 1,6
0,15/2T.	11	17	10	6	11	4,6 1,0
0,20/5T.	18	8	9	4	10	5,9 0,4

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	149	126	125	194	122	22,6 61,1 Bezgr.:
0,01/500	165	212	152	202	182	28,8 59,8
0,025/500	100	111	95	115	105	9,3 34,5
0,050/500	58	60	121	64	76	30,3 24,8
0,075/500	41	30	27	45	36	8,6 11,7
0,10/500	6	3	7	14	8	4,7 2,5
0,15/2T.	11	9	11	11	11	1,0 0,8
0,20/5T.	13	7	9	5	9	3,4 0,3

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	119	155	169	142	146	21,3 73,1 Bezgr.:
0,01/500	188	352	277	329	287	72,8 78,4
0,05/500	92	94	55	93	84	19,0 22,8
0,075/500	45	20	40	24	32	12,1 8,8
0,2/1T.	5	5	3	10	6	3,0 0,8
0,3/2T.	2	0	2	6	3	2,5 0,2 n.g.w.

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	82	83	75	v.p.!	80	4,4 40,0 Bezgr.:
0,075/500	82	55	93	106	84	21,7 42,0
0,2/500	37	31	22	20	25	8,0 12,5
0,6/2T	3	8	10	v.p.!	7	3,6 0,8 n.g.w.

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	138	126	108	135	127	13,5 63,4 Bezgr.:
0,05/500	98	63	78	76	79	14,5 25,0
0,10/500	23	20	19	15	19	3,3 6,1
0,40/2T.	1	1	0	0	1	0,04 n.g.w.
0,8/4T.	0	0	0	0	---	---

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 4 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 2 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	98	62	90	65	79	18,0 39,4 Bezgr.:
0,01/200	42	39	61	41	46	10,2 58,1
0,05/500	15	8	19	14	14	4,5 7,1
0,10/1T.	4	3	1	3	3	1,3 0,7 n.g.w.

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 8 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 2 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	126	87	76	88	94	21,9 47,1 Bezgr.:
0,010/200	40	65	53	48	52	10,5 54,7
0,015/200	56	50	36	31	43	11,7 45,9
0,025/500	104	75	64	100	86	19,4 36,4
0,035/500	63	55	53	48	55	6,2 23,2
0,050/500	41	52	58	27	45	13,6 18,9
0,075/500	32	33	17	34	29	8,0 12,3
0,10/1T.	28	20	30	38	29	7,4 6,2

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 8 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 2 Einsaat: 500T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	66	99	94	92	88	14,8 43,9 Bezgr.:
0,010/500	114	118	120	106	115	6,2 52,2
0,015/500	107	100	149	159	129	29,6 58,7
0,025/500	61	55	74	101	73	20,4 33,1
0,035/500	75	72	50	60	64	11,5 29,3
0,050/2T.	122	111	105	134	118	12,8 13,4
0,075/5T.	117	71	103	68	90	24,1 4,1

1 86 1

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 8 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 3 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	137	163	150	176	157	16,8 78,6 Bezgr.:
0,01/500	198	166	178	168	178	14,6 45,3
0,025/500	48	38	33	64	46	13,7 11,7

1 87 1

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	87	86	114	111	100	15,1 49,8 Bezgr.:
0,01/500	160	164	153	135	153	12,8 61,4
0,015/500	82	158	173	123	134	40,5 53,8
0,025/500	121	129	101	81	108	21,5 43,5
0,035/500	43	42	35	38	40	3,7 15,9
0,050/500	8	7	8	6	7	1,0 2,9

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: B-14		Alter der Passage: 4		Einsaatz: 100T.	
c/Einsaatz	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	Bezgr.:
0/200	112	110	72	96	18,4 48,8
0,01/500	105	140	162	141	137 23,6 56,1
0,015/500	199	151	169	127	162 30,3 66,2
0,025/500	109	107	118	102	109 6,7 44,7
0,035/500	57	82	53	94	72 19,7 29,3
0,050/500	21	21	14	14	18 4,0 7,2
0,075/2T.	26	24	23	20	23 2,5 2,4
0,10/5T.	40	25	13	27	26 11,1 1,1

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: B-14		Alter der Passage: 4		Einsaatz: 100T.	
c/Einsaatz	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	Bezgr.:
0/200	146	147	171	166	158 12,9 78,8
0,01/500	359	344	356	314	343 20,5 87,2
0,05/1T.	50	50	56	69	56 9,0 7,1
0,10/5T.	19	4	11	10	11 6,2 0,3

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 4 Einsaat: 100T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	178	188	147	189	176	19,6 87,8 Bezgr.:
0,01/500	345	344	256	295	318	31,4 72,3
0,025/500	125	142	176	127	143	23,6 32,4
0,050/500	13	17	18	12	15	2,9 3,4

Versuchseinheit: Einwirkdauer von Adriamycin 24 Stunden

Zelllinie: B-14 Alter der Passage: 5 Einsaat: 70T.						
c/Einsaat	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	$\bar{x}$	sfr.
0/200	98	114	97	70	95	18,2 47,4 Bezgr.:
0,025/500	125	123	125	111	121	6,7 51,1
0,050/500	54	46	48	v.p.!	49	4,2 15,6
0,10/1T.	8	16	7	10	10	4,0 2,1
0,20/2T.	1	2	4	3	3	1,3 0,3 n.g.w.

9.2) Erläuterungen und Erklärung der statistischen Auswertungsmethoden

Regressionsanalyse:

In unseren Versuchen wurden jeweils zwei quantitative Merkmale beobachtet und zwar in Form einer unabhängigen Variablen x , z.B. der Adriamycin-Konzentration, oder der Dauer der Vorinkubation bei Adriamycin und einer ihr zugeordneten abhängigen Variablen y , etwa der Überlebensrate. Wird nun jedes Wertepaar, das durch die Merkmale x und y festgelegt ist, in einem rechtwinkligen Koordinatensystem dargestellt, so erhält man innerhalb des vorgegebenen Wertebereichs eine Punktwolke. (30)

Weil zwischen der unabhängigen und der abhängigen Variablen ein linearer Zusammenhang angenommen wurde, wurde zur Auswertung der Versuchsergebnisse das Regressionsmodell herangezogen.

Die allgemeine Formel der Regressionsgleichung

$$f(x) = y = Bx + B_0$$

setzt sich, bezogen auf die Versuchsparameter dieser Arbeit aus folgenden Einzelkomponenten zusammen:

Y wird als Zehnerlogarithmus der Überlebensrate in Prozent angegeben - $y = \log(\text{sfr. \%})$,

der Abszissenwert x - die jeweils unabhängige Variable - steht für die einzelnen Konzentrations- bzw. Zeitstufen, B ist der Regressionskoeffizient, der die Steigung der Gerade angibt,

B_0 ist die additive Konstante und charakterisiert den Schnittpunkt der Gerade mit der y -Achse für $x = 0$. (30)

Korrelationskoeffizient:

Er läßt sich aus dem Regressionsmodell ableiten und ist ein Maß für die Straffheit des wechselseitigen Zusammen-

hangs. Er kann die Extremwerte +1 und -1 annehmen. Dabei bezieht sich das Vorzeichen lediglich auf die Richtung der linearen Beziehung zwischen den beiden Variablen. Ist der Wert des Korrelationskoeffizienten 0, besteht keine Beziehung zwischen x und y, z.B. zwischen der Anzahl der Spülungen und Zellkulturen und der ermittelten Überlebensrate, ist er +1 oder -1 eine streng lineare. (30)

Zweistichprobentest bei unverbundenen Stichproben:

liegen vor, wenn paarige Beobachtungen - Vergleich zweier Gruppen von Individuen oder Parameter - unabhängig voneinander sind.

Bezogen auf unsere Versuche wurden Ergebnisse auf Grund variierender Einwirkzeiten von Adriamycin und Gewinnung mehrerer Meßwerte pro Experiment durch Zellkulturen verschiedener Passagen erhalten. Da also unsere Einzelversuche nicht an ein- und denselben Zellkulturen vorgenommen wurden, konnten zur Auswertung Testmodelle für unverbundene Stichproben herangezogen werden. (30)

Einfache Varianzanalyse:

Grundfrage bei der Einfachklassifikation der Varianzanalyse ist der simultane Vergleich mehrerer Mittelwerte. Die Nullhypothese (H_0) bei allen Modellen der Varianzanalyse geht davon aus, daß die beobachteten Mittelwerte verschieden festgelegter Datengruppen Stichproben aus einer einheitlichen Grundgesamtheit sind. Zur Erklärung, warum die Einfache Varianzanalyse zur Versuchsauswertung verwendet wurde, ein Beispiel aus den Versuchsreihen: Vergleich der Überlebensrate von B-14 Zellen, deren Expositionszeit gegenüber einer konstanten Adriamycinkonzentration 4, 8 und 24 Stunden betrug. Für jede Einwirk-

dauer wurden mindestens drei Versuche durchgeführt. Der Datenumfang für einzelne Gruppen kann unterschiedlich sein; das ist in dieser Arbeit auch der Fall. Ho würde nun lauten: Die Überlebensraten für die drei Expositionszeiten unterscheiden sich nicht, d. h. die Überlebensraten erreichen, von Zufallsschwankungen abgesehen, den gleichen Wert.

Dagegen hieße die Alternativhypothese (H_1): Bei mindestens einer Einwirkdauer ist ein Unterschied festzustellen. Die Varianzanalyse setzt eine Normalverteilung der Fehler und damit auch der Beobachtungswerte voraus, ferner gleiche Fehlerstreuung in allen Gruppen. Kann davon nicht ausgegangen werden, wie etwa in einigen Vorversuchen, müssen parameterfreie Tests verwendet werden. (10)

Dreifache Varianzanalyse:

Während bei der Einfachen Varianzanalyse das Verhalten eines Parameters - Überlebensrate - durch Veränderung einer Variablen - Expositionszeit - über n-Gruppen über 4, 8, 16 und 24 Stunden betrachtet wurde, kommen analog bei der Dreifachen Varianzanalyse zwei weitere unabhängige Variable hinzu. Es werden alle unabhängigen Testvariablen, nämlich die Konzentration, die Einwirkdauer und die Zelllinien daraufhin überprüft, ob sie als Einzelgröße in Zweier,- oder gar Dreierkombinationen die Überlebensrate signifikant verändern. Anders formuliert: Dem Autor lag daran festzustellen, ob beliebige Konstellationen der drei Beobachtungsmerkmale einen signifikanten Einfluß auf die Überlebensrate haben, wobei das Signifikanzniveau in der Auswertung 5% betrug, d. h. mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% kann H_1 angenommen werden. (23)

Kruskal-Wallis-Test:

Er ermöglicht einen parameterfreien Vergleich von k unabhängigen Stichproben. Dieser Test wurde bei fast allen Vorversuchen anstelle einer Einfachen Varianzanalyse angewendet, weil für deren Durchführung die entsprechenden Voraussetzungen nicht erfüllt waren. In unserem Fall differieren in den einzelnen Versuchsabschnitten die Standardabweichungen zwischen Minimal- und Maximalwert im Verhältnis 1:4, so daß eine F-Verteilung der Daten nicht gesichert ist. Sie kann jedoch angenommen werden, wenn die Zahl der Freiheitsgrade ≥ 5 ist; der ausgedruckte H-Wert wurde dann in den Tabellen für eine F-Verteilung nachgeschlagen. In unseren Versuchen betrugen die Fallzahlen meist drei oder vier, so daß der H-Wert mit dafür vorgesehenen Tabellen im Institut für Statistik und Biomathematik (Klinikum Großhadern) verglichen wurde. (23)

Dunnet-Test:

Bei einem Nebenversuch, der Vorinkubation von Adriamycin bis maximal 24 Stunden, sollte festgestellt werden, ob sich die Mittelwerte der Überlebensquoten bei 4, 6 und 8 Stunden von den Langzeitwerten bei 12, 16 und 24 Stunden unterscheiden. Hierzu gelangte der Dunnet-Test zur Anwendung, mit dem beliebige Stichprobenblöcke (Mittelwertvergleiche) auf Signifikanz überprüft werden können.

Der ausgedruckte Z-Wert ist ein Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit einer Standardnormalverteilung der Beobachtungswerte. Der Dunnet-Test wurde angewendet, weil er für einen parameterfreien Vergleich von n-Stichprobenblöcken geeignet ist; er wurde bei Bedarf im Anschluß an den Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. (30)

Lebenslauf

Ich wurde am 9. Juli 1953 als Sohn des Elektromonteurs Paul Walter und seiner Frau Maria, geb. Schuster in Reding geboren. Zwischen September 1960 und Juli 1965 besuchte ich die Volksschule in Ering/Inn und trat im September 1965 in das Tassilo-Gymnasium in Simbach/Inn ein. Dort legte ich am 22. Juni 1974 nach Absolvierung der Kollegstufe das Abitur ab.

In der Zeit vom Wintersemester 1974/75 bis zum Sommersemester 1980 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität Humanmedizin, an der ich am 7. und 30. Oktober das Staatsexamen ablegte. Am 7. November 1980 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Gegenwärtig arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Radiologie und Nuklearmedizin der Tumornachsorgeklinik Bad Trissl in Oberaudorf.

* * *

